

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PÚBLICA
Y MICROBIOLOGÍA



**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR gG Y SECUENCIAS DE
EMPAQUETAMIENTO (*pac*) DEL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA**

ANA LUISA MUÑOZ RAMÍREZ.
Madrid, 2007

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA, SALUD PÚBLICA Y
MICROBIOLOGÍA

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR gG Y SECUENCIAS DE
EMPAQUETAMIENTO (*pac*) DEL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA**

Memoria presentada por **Ana Luisa Muñoz Ramírez.**

Para optar al grado de Doctor en Microbiología

Director de la Tesis:

Dr. ENRIQUE TABARÉS LÓPEZ.

Este trabajo ha sido realizado en el **Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.**

Ana Luisa Muñoz Ramírez ha realizado su Tesis Doctoral becada por la fundación The Wellcome Trust (UK) (075813/C/04/Z). El trabajo ha sido financiado en parte por los proyectos: SAF2004-08015 del Ministerio de Educación y Ciencia de España y 075813/C/04/Z de la fundación The Wellcome Trust (UK).

Enrique Tabarés López, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Informa:

Que Doña Ana Luisa Muñoz Ramírez ha realizado bajo mi dirección el trabajo “Análisis funcional del promotor gG y secuencias de empaquetamiento del virus de la pseudorrabia”. Este trabajo forma parte de la línea de investigación del laboratorio que trata de utilizar el virus de la pseudorrabia (PRV) como vector de expresión en el campo del desarrollo de vacunas y en terapia génica. En el trabajo se analiza y caracteriza el promotor del gen gG del virus para regular la expresión de las proteínas foráneas de interés y se han construido BACs deficientes en secuencias empaquetamiento del DNA del virus (secuencias pac), y de la única proteína inmediatamente temprana (IE180) del virus. Con estos BAC se han analizado las secuencias pac y servirán en el futuro para obtener amplicones libres de virus que se usarán de vectores en terapia génica.

De los resultados de este trabajo:

1.- Se ha presentado en congresos:

A. L. Muñoz, B. Martín, C. Prieto, E. Tabarés. 2007. Estudio funcional del promotor del gen gG del virus de la pseudorrabia (PRV) mediante amplicones y virus recombinantes. Tipo de participación: comunicación oral. Congreso: IX Congreso Nacional de Virología. Zaragoza. Abril 2007

A. L. Muñoz, L. Varela, A. Martínez, B. Martín, E. Tabarés. 2007. Construcción y caracterización de BACs del virus de la pseudorrabia para la obtención de amplicones libres de virus

Tipo de participación: comunicación oral. IX Congreso Nacional de Virología. Abril 2007.

2.- Ha dado lugar a una publicación:

A. L. Muñoz, C. Prieto, E. Tabarés. 2006. A comparison of enhanced green fluorescent protein expression induced by immediate-early cytomegalovirus (IE-CMV) and gG pseudorabies virus (gG-PRV) promoters, using pseudorabies virus amplicons as vectors. Journal of Virological Methods 136, 257-260

3.- Existen tres publicaciones más que se encuentran sometidas a publicación o en preparación:

A. L. Muñoz, B. Martín and E. Tabarés. 2007. Immediate early expression of pseudorabies virus gG glycoprotein. Sometido a publicación.

S. Gómez-Sebastián, A. L. Muñoz , F. Lim, and E. Tabarés 2007.Complementation and interference between herpes simplex virus type 1 and pseudorabies virus infections.Sometido a publicación.

Abel Viejo-Borbolla, Ana Luisa Muñoz, Enrique Tabarés and Antonio Alcamí. 2007. Glycoprotein G from pseudorabies virus binds to chemokines and inhibits their function.En preparación.

Durante la realización del trabajo, Ana Luisa Muñoz Ramírez ha demostrado muy alta capacidad para desarrollar el trabajo de investigación, excelente aptitud y dedicación al trabajo, así como también excelente relación con todos los compañeros del departamento.

En Madrid a diez de noviembre de dos mil siete

Fdo Enrique Tabarés López

A mí madre, el pito, el tío y la nena
Por su amor infinito, por moldearme
y sobre todo por nunca estar lejos.

AGRADECIMIENTOS

En el camino recorrido para lograr conseguir esta meta me he cruzado con muchas personas, que de una u otra manera han contribuido para que hoy éste pueda ver su fin, por ello estoy profundamente agradecida con:

El Dr. Enrique Tabarés por dejarme entrar en su laboratorio sin saber nada de mí, por iniciarme en el mundo de la ciencia y de la biología molecular, pero sobre todo por su apoyo constante y por enseñarme a ser mejor persona.

El departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología por aceptarme y a Mila por sus palabras siempre de aliento y sus oportunas gestiones.

Sole, porque esté donde esté nunca olvidare su disposición y su fortaleza!!!

Bea por traer consigo mucha luz y por su constante y eficiente colaboración.

Las compañeras que han pasado por el D-11: Lourdes por su paciencia en mis malos inicios, Silvia por su orientación, interés y buenos consejos, Nuria, Raquel y Adriana por la "cháchara".

Los compañeros del D-20: M^a Jesús y Carmen M por su apoyo, colaboración, disposición, a Jesús por soportarme. Y los que ya no están: muy especialmente a Carmen M por su vitalidad y por hacer siempre una buena atmósfera y a Marta por sus consejos, a M^a José, Adriana, Oscar por los buenos momentos, Josefina por sus ricas tortillas y su ternura.

Los compañeros del departamento: M^a Cruz, Mayca, Luz, Clemen, Ester, M^a Gel, José...por el apoyo y el interés. Las chicas de la paz por su alegría y colaboración.

Por ayudarme con mis problemas informáticos con Toño, Juanjo y Quecha.

Como no, con Aleja por su cooperación con el desarrollo de una parte de los experimentos, pero sobre todo principalmente por los sueños compartidos y no sólo los sueños: el techo, las alegrías, las vivencias, las tristezas...todo lo que ha hecho posible que llevemos media vida juntas.

Fer, por abrirme un campito en su corazón y en su vida, por darle color e ilusión a mis días, por soportar serenamente mi "ausencia", por su entrega, por recoger mis pedacitos, por transformar mi vida!!!.

El motor de mi vida, mi familia, no tengo palabras para expresar la gratitud que siento por todo lo que han invertido en mí: dedicación, esfuerzo, ejemplo, colaboración, apoyo...

Mis ángeles que desde el cielo me cuidan e iluminan✿.

Finalmente con Dios por que ha colmado mi vida de bendiciones!!

A TODOS SINCERAS E INMENSAS GRACIAS!!!

ABREVIATURAS

ActD	Actinomicina D
Amp	Ampicilina
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
CAF	Cloramfenicol
Cél	Células
CHX	Cicloheximida
CMV	Citomegalovirus
cps	Cuentas por segundo
DATD	N-N'-dialiltartardiamina
DICT₅₀ = TDCI₅₀	Dosis infecciosa 50 en cultivo de tejidos
DMEM	Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E = (β)	Genes o proteínas Tempranos
EC	Efecto citopático
EGFP	Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzimoimmunoensayo
g	Gramo
GCV	Ganciclovir
gG	Glicoproteína gG de PRV
HSV	herpes virus
HSV-1/HSV-2	Herpes simplex virus tipo 1/tipo 2
ICP	Proteínas de la infección
IE = (α)	Genes o proteínas Inmediatamente Tempranos
IE180	Proteína IE180 de PRV
IE180 IR	Copia del gen IE180 en la zona Interna Repetida
IE180 TR	Copia del gen IE180 en la zona Terminal Repetida
IE-CMV	Promotor inmediatamente temprano de CMV
IPTG	Isopropil-b-D-Thiogalactopiranosido
IR	Repetición Interna
kpb	Kilopares de bases
L = (γ)	Genes o proteínas Tardíos
LAT	Transcrito asociado a latencia

LB	Medio Luria Bertani
M	Molar
M.O.I	Multiplicidad de Infección
µg	Microgramos
mg	Miligramos
µl	Microlitro
ml	Mililitro
NP40	Nonidet P-40
nt	Nucleótido
°C	Grado centígrado
Ori	Origen de replicación
PAA	Ácido Fosfonoacético
<i>pac1</i> IR	Región <i>pac1</i> en la zona Interna Repetida
<i>pac1</i> TR	Región <i>pac1</i> en la zona Terminal Repetida
<i>pac2</i> inv	Región <i>pac2</i> invertida
<i>pac2</i> D	Región <i>pac2</i> directa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRV	Virus de la Pseudorrabia
rpm	Revoluciones por minuto
RR	Ribonucleótido reductasa
SDS	Dodecilsulfato sódico
STF	Suero de ternera fetal
SV40	Virus del simio 40
TK	Timidina quinasa
TR	Repetición Terminal
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U.F.P	Unidades formadoras de placas
UL	Región del genoma de PRV única larga
US	Región del genoma de PRV única corta
WB	"Western blot"
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indol-b-D-galactósido
ZRHD	Zona de recombinación homóloga derecha
ZRHI	Zona de recombinación homóloga izquierda

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA (PRV)	1
1.1.1. ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA	3
1.1.1.1. “Core”	4
1.1.1.2. Cápside icosaédrica	4
1.1.1.3. Tegumento	4
1.1.1.4. Envoltura	4
1.1.2. GENOMA	5
1.1.3. CICLO REPLICATIVO	5
1.1.3.1. Entrada	7
1.1.3.2. Expresión génica	8
1.1.3.2.1. Genes inmediatamente tempranos (genes α)	9
1.1.3.2.1.1. IE180 de PRV	9
1.1.3.2.2. Genes tempranos (genes β)	10
1.1.3.2.2.1. Timidina quinasa (TK)	10
1.1.3.2.2.2. Glicoproteína gG de PRV	10
1.1.3.2.3. Genes tardíos (genes γ)	11
1.1.3.3. Encapsidación y empaquetamiento	11
1.1.3.4. Salida	14
1.2. ENFERMEDAD DE AUJESZKY	15
1.2.1. VACUNAS ATENUADAS FRENTE A PRV	16
1.3. TERAPIA GÉNICA	18
1.3.1. VECTORES EN TERAPIA GÉNICA	18
1.3.1.1. Amplicones	18
1.3.1.2. BACs	19
1.3.1.3. Virus recombinantes	20

1.3.2. PRV COMO VECTOR EN TERAPIA GÉNICA Y AGENTE ONCOLÍTICO.....	21
2. OBJETIVOS	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. MATERIALES.....	27
3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIOS DE CULTIVO	27
3.1.1.1. Líneas celulares.....	27
3.1.1.2. Virus.....	27
3.1.1.2.1. Virus de la Pseudorrabia: Cepas	27
3.1.1.3. Cepas de <i>E. coli</i>	28
3.1.1.4. Medios de cultivo	28
3.1.1.4.1. Medios para cultivos celulares.....	28
3.1.1.4.2. Medios para cultivos bacterianos.....	29
3.1.2. PLÁSMIDOS	29
3.1.2.1. Vectores de clonaje	29
3.1.2.2. Otros plásmidos.....	30
3.1.2.3. Amplicones	31
3.1.3. ENZIMAS.....	31
3.1.4. PRODUCTOS Y REACTIVOS.....	31
3.1.4.1. Antibióticos	31
3.1.4.2. Anticuerpos.....	31
3.1.4.3. Colorantes	31
3.1.4.4. Electroforesis	31
3.1.4.5. Inhibidores	32
3.1.4.6. Productos radiactivos.....	32
3.1.4.7. Otros reactivos.....	32
3.1.4.8. Software.....	33
3.2. MÉTODOS	33
3.2.1. CULTIVOS CELULARES Y CONSERVACIÓN	33

3.2.2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS.....	34
3.2.2.1. Transfección por precipitación con fosfato cálcico.....	34
3.2.2.2. Transfección por lipofectamina	34
3.2.2.3. Transfección por FuGENE	34
3.2.3. PRODUCCIÓN Y CONSERVACIÓN DE VIRUS	35
3.2.4. TITULACIÓN VÍRICA.....	35
3.2.5. OBTENCIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES.....	36
3.2.6. CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS.....	37
3.2.7. TRANSFORMACION DE BACTERIAS.....	37
3.2.7.1. Preparación de células competentes	37
3.2.7.2. Transformación de células procariotas por Electroporación.....	37
3.2.8. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	38
3.2.8.1. Aislamiento de DNA vírico	38
3.2.8.2. Aislamiento del DNA plasmídico	39
3.2.8.3. Aislamiento de DNA de BAC.....	39
3.2.9. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	40
3.2.9.1. Electroforesis en geles de agarosa.....	40
3.2.9.2. Amplificación del DNA por PCR.....	40
3.2.9.3. Secuenciación automática	41
3.2.9.4. Hibridación DNA-DNA “Southern blot”	43
3.2.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	43
3.2.10.1. Preparación de extractos celulares	43
3.2.10.2. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	44
3.2.11. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN <i>E. coli</i>	44
3.2.11.1. Inducción de la expresión de proteínas en <i>E. coli</i>	44
3.2.11.2. Purificación de las proteínas mediante electroelución.....	45
3.2.12. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS	46
3.2.13. MÉTODOS DE INMUNODETECCIÓN.....	47
3.2.13.1. “Western blot”	47
3.2.13.2. ELISA	47

4. RESULTADOS	49
4.1. COMPARACIÓN DEL PROMOTOR gG DE PRV Y DEL PROMOTOR IE DEL CITOMEGALOVIRUS (IE-CMV)	51
4.1.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS	51
4.1.1.1. Obtención del plásmido pZRHEGFP	51
4.1.1.2. Obtención y caracterización de los plásmidos pZGF-SD Y pZGF-SD4	53
4.1.1.2.1. Cambio del poli A de la TK de HSV-1 por el poli A de SV40	53
4.1.1.2.2. Eliminación de la secuencia del péptido señal en el plásmido pZHU-GF-E	54
4.1.1.3. Obtención y caracterización del plásmido pSD4-AG	58
4.1.1.4. Obtención y caracterización del plásmido p180FG	60
4.1.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AMPLICONES	61
4.1.2.1. Obtención y caracterización del amplicón pOGFP	62
4.1.2.2. Obtención y caracterización de los amplicones pOGF- SD Y pOGF-SD4	62
4.1.2.3. Obtención y caracterización del amplicón pOSD4-AG	63
4.1.3. Expresión celular de la EGFP	64
4.1.3.1. Análisis de la expresión en células 293T	64
4.1.3.2. Análisis comparativo de la expresión de la EGFP, bajo los dos promotores, en células 293T y Vero	65
4.1.4. INFLUENCIA DE LA ZONA DE FUSIÓN DEL PEPTIDO SEÑAL DE LA gG SOBRE LA INTENSIDAD FLUORESCENTE DE LA EGFP	67
4.2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROMOTOR gG (PgG) de PRV	68
4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL PgG DE PRV COMO GEN IE POR MEDIO DE AMPLICONES Y PLÁSMIDOS	68
4.2.1.1. Estudio comparativo entre el promotor gG y el promotor IE180	70

4.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL PgG DE PRV COMO GEN IE POR MEDIO DE VIRUS RECOMBINANTES	72
4.2.2.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES	73
4.2.2.1.1. Obtención del virus recombinante D3	74
4.2.2.1.2. Obtención del virus recombinante Z1	74
4.2.2.1.3. Obtención del virus recombinante S3	75
4.2.2.1.4. Caracterización virus recombinantes Z Y S	76
4.2.2.1.5. Obtención del recombinante R10.....	77
4.2.2.1.5.1. Caracterización del virus recombinante R10	77
4.2.2.1.6. Obtención y caracterización de virus recombinantes gG negativos.....	79
4.2.2.2. Expresión de la EGFP y la gG bajo el control del PgG de PRV por medio de virus recombinantes	81
4.2.2.2.1. Expresión de la IE180 de PRV.....	83
4.2.2.2.2. Expresión de la EGFP	84
4.2.2.2.3. Expresión de la gG de PRV	85
4.2.2.2.3.1. Expresión de la gG en <i>E.coli</i>	85
4.2.2.2.3.2. Obtención de anticuerpos monoespecíficos frente a la gG de PRV.....	86
4.2.2.2.3.3. Inmunodetección de la gG de PRV en virus recombinantes	88
4.2.3. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PgG de PRV MEDIANTE LA INFECCIÓN por HSV-1	89
4.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS <i>pac</i> DEL PRV	94
4.3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS BACs.....	95
4.3.1.1. BAC 18.....	96
4.3.1.2. BAC 51.....	96
4.3.1.3. BAC 60.....	98
4.3.1.4. BAC 70.....	102
4.3.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS <i>pac</i>	108
4.3.3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS BACS	108

4.3.3.1. Obtención del plásmido pIE180	109
5. DISCUSIÓN.....	112
5.1. PRV COMO VECTOR DE EXPRESIÓN	113
5.2. ACTIVIDAD IE DEL PROMOTOR gG	115
5.3. EFECTO DE LA ACTIVIDAD DEL PgG POR HSV-1	118
5.4. EFECTOS DE LA DELECCIÓN DE LAS SECUENCIAS <i>pac</i> EN EL EMPAQUETAMIENTO DE PRV.....	119
6. CONCLUSIONES	124
7. BIBLIOGRAFÍA.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1.	Morfología de los herpesvirus	3
Figura 2.	Esquema del genoma de PRV	5
Figura 3.	Esquema ciclo replicativo de PRV	7
Figura 4.	Ubicación de las secuencias <i>pac</i> en el genoma de PRV	13
Figura 5.	Proceso de empaquetamiento	14
Figura 6.	Cerdo afectado por la enfermedad de Aujeszky	16
Figura 7.	Esquema de la Extracción del DNA vírico total	39
Figura 8.	Transferencia de ácidos nucleicos por capilaridad	44
Figura 9.	Esquema representativo: la realización de un ELISA	48
Figura 10.	Comparación de intensidad de la fluorescencia entre los amplicones pOGFP y pORIPAC-GF	52
Figura 11.	Mapas de restricción. Plásmidos pZRHEGFP, pZGF-SD y pSD4-AG	53
Figura 12.	Comparación de la intensidad de fluorescencia producida por pZHU-GF-E y pORIPAC-GF	54
Figura 13.	Estrategia de eliminación del péptido señal en el plásmido pZHU-GF-E	55
Figura 14.	Amplificación de la secuencia sin péptido señal	55
Figura 15.	Caracterización del plásmido pCG	56
Figura 16.	Secuencia del plásmido pZHU-GF-E	56
Figura 17.	Caracterización de los plásmidos pZGF- SD y pZGF-SD4 por endonucleasas de restricción	57

Figura 18.	Amplificación del gen poli A de la gG de PRV	58
Figura 19.	Caracterización colonias pGpoliAgG	59
Figura 20.	Caracterización colonias pSD4-AG.....	59
Figura 21.	Caracterización del plásmido p180FG	61
Figura 22.	Mapas de restricción de los amplicones	62
Figura 23.	Caracterización del amplicón pOGF-SD	63
Figura 24.	Caracterización del amplicón pOSD4-AG por enzimas de restricción	63
Figura 25.	Expresión de la EGFP en células transfectadas	65
Figura 26.	Inmunodetección de la EGFP y actina en células transfectadas	65
Figura 27.	Expresión celular de la EGFP en células Vero	66
Figura 28.	Comparación de la expresión de la EGFP en células 293T y Vero por inmunodetección	67
Figura 29.	Expresión celular de la EGFP en células transfectadas con amplicones.....	68
Figura 30.	Expresión celular de la EGFP con un comportamiento α	69
Figura 31.	Expresión de la EGFP bajo el control del PgG por plásmidos y amplicones.....	70
Figura 32.	Comparación de la expresión de la EGFP bajo el control de diferentes promotores	71
Figura 33.	Estrategia para la obtención de virus recombinantes	73
Figura 34.	Comparación de la expresión de EGFP celular entre los virus D3 y S3.....	74
Figura 35.	Comparación de expresión de la EGFP entre los virus recombinantes Z1 y S3	75
Figura 36.	Caracterización de los virus recombinantes Z y S	76
Figura 37.	Comparación de expresión de la EGFP entre los virus recombinantes R10 y S3.....	77

Figura 38.	Caracterización del virus recombinante R10.....	78
Figura 39.	Caracterización del virus recombinante R10.....	78
Figura 40.	Caracterización de virus recombinantes XGF-N y XGF-G	80
Figura 41.	Diagrama esquemático del genoma de los virus recombinantes	81
Figura 42.	Síntesis de la EGFP por los virus recombinantes XGF-N, XGF-G, S3, R10, D3	83
Figura 43.	Inmunodetección de la IE180 a partir de extractos en presencia de inhibidores	84
Figura 44.	Inmunodetección de la EGFP a partir de extractos en presencia de inhibidores	85
Figura 45.	Inducción de la gG	86
Figura 46.	Caracterización de los sueros monoespecíficos frente a la glicoproteína gG de PRV mediante ELISA.....	87
Figura 47.	Caracterización del antisuero monoespecífico 3 frente a la gG	88
Figura 48.	Inmunodetección de la gG a partir de extractos en presencia de inhibidores	89
Figura 49.	Replicación del virus S3 durante coinfección con el virus HSV-1 en células E5.....	91
Figura 50.	Producción de virus 48h después de las coinfecciones S3-HSV-1 en células E5	92
Figura 51.	Replicación del virus S3 durante coinfección con el virus HSV-1 en células Vero.....	93
Figura 52.	Producción de virus 48h después de las coinfecciones S3-HSV-1 en células Vero	94
Figura 53.	Esquemas: Mapa del plásmido pGETrec y del pBecker2	95
Figura 54.	Estrategia de obtención del plásmido pCLR-K.....	97
Figura 55.	Caracterización de los BAC 51 y 52.....	98
Figura 56.	Caracterización del plásmido pCRN	99

Figura 57.	Caracterización plásmido pKC.....	100
Figura 58.	Caracterización del plásmido pOK.....	100
Figura 59.	Caracterización del plásmido pOKC	101
Figura 60.	Caracterización del BAC 60	102
Figura 61.	Caracterización del plásmido pTCO	103
Figura 62.	Caracterización de los plásmidos pTCO, p8TC y p8TCO por enzimas de restricción	104
Figura 63.	Caracterización del BAC 70	106
Figura 64.	Diagramas esquemáticos del genoma de los BACs.	107
Figura 65.	Producción de virus o de amplicones por medio de los BACs.....	109
Figura 66.	Mapa de restricción del plásmido pIE180 y Expresión de la IE180 por el plásmido pIE180	110
Figura 67.	Producción de amplicones por el BAC 70.....	111

TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de la familia <i>herpesviridae</i>	2
Tabla 2.	Iniciadores empleados en el estudio.....	4

La ciencia, a pesar de sus progresos increíbles, no puede ni podrá nunca explicarlo todo. Cada vez ganará nuevas zonas a lo que hoy parece inexplicable. Pero las rayas fronterizas del saber, por muy lejos que se eleven, tendrán siempre delante un infinito mundo de misterio.

Gregorio Marañón

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA (PRV)

El virus de la Pseudorabia (PRV), también conocido como virus de la enfermedad de Aujeszky, pertenece a la familia *Herpesviridae*, subfamilia *alphaherpesvirinae*, género *Varicellovirus*. El cerdo es su hospedador natural sin embargo también infecta: gatos, perros, cabras, pollos, roedores, vacas, produciendo enfermedad neurológica a menudo fatal (Paul et al., 2003) pero no es infectivo para primates superiores (Enquist et al., 1998, Sawitzky, 1997, Tirabassi et al., 1998).

Los herpesvirus están ampliamente diseminados en la naturaleza, la mayoría de especies animales son infectadas por algún tipo de herpesvirus, aproximadamente se han caracterizado 130 herpesvirus (Knipe., et al 2001).

Los herpesvirus comparten cuatro propiedades biológicas:

1. Tienen un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de los ácidos nucleicos, síntesis de DNA y en el procesamiento de proteínas.
2. La síntesis del DNA vírico y el ensamblaje de la cápside tienen lugar en el núcleo de la célula infectada (Enquist et al., 1998).
3. La célula infectada es destruida cuando hay producción de progenie vírica.
4. Poseen la capacidad de establecer latencia en sus hospedadores naturales. Los mecanismos que conducen a la reactivación del estado de latencia no están muy claros y pueden diferir de unos virus a otros.

Los herpesvirus se subdividen, según sus propiedades biológicas y el contenido y organización de su genoma, en tres subfamilias *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammapherpesvirinae* (**Tabla 1**).

Los miembros que pertenecen a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* tienen el más amplio rango de hospedadores, un ciclo reproductivo relativamente corto, rápida diseminación en cultivos celulares, destrucción de las células infectadas y capacidad para establecer infecciones latentes pero no exclusivamente en ganglios sensoriales. Los miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* se caracterizan por tener un rango más restringido de hospedadores, un ciclo reproductivo más largo, donde frecuentemente las células infectadas muestran citomegalia, establecen latencia en diferentes tejidos y células incluyendo glándulas secretoras, células linforeticulares y células del riñón. Los miembros de la subfamilia *Gammapherpesvirinae* tienen un rango mucho más restringido de hospedadores, infectan células linfoblastoides, usualmente linfocitos B y T, normalmente se mantienen de forma latente en el tejido linfoide.

Subfamilia	Género	Especies	Latencia
<i>Alphaherpesvirinae</i>	<i>Simplexvirus</i>	HSV-1, HSV-2, Virus- B	tejido nervioso (neuronas)
	<i>Varicellovirus</i>	VZV, PRV, BoHV-1, EHV-1	
	"MD virus" "ILTV-like virus"	GaHV-2, GaHV-3	
<i>Betaherpesvirinae</i>	<i>Citomegalovirus</i>	CMV	leucocitos (monocitos), células epiteliales
	Muromegalovirus	MuHV-1, MuHV-2	
	Roselovirus	HHV-6, HHV-7	
<i>Gammapherpesvirinae</i>	<i>Lymphocryptovirus</i>	EBV	Linfocitos B
	<i>Rhadinovirus</i>	HHV-8, SaHV-2	Linfocitos T

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia *herpesviridae*.

1.1.1 ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA

La arquitectura del virion de PRV conserva las características de los miembros de familia *Herpesviridae* (**Figura 1**), es decir virus DNA de doble cadena cuya arquitectura consiste en un “core” que a su vez contiene la doble cadena de DNA lineal, una cápside icosaédrica de aproximadamente 100 a 110 nm de diámetro que contiene 162 cápsomeros, un material amorfo, algunas veces asimétrico que rodea la cápside y se denomina tegumento y finalmente una envoltura que contiene las glicoproteínas virales en su superficie (Roizman et al., 1993).

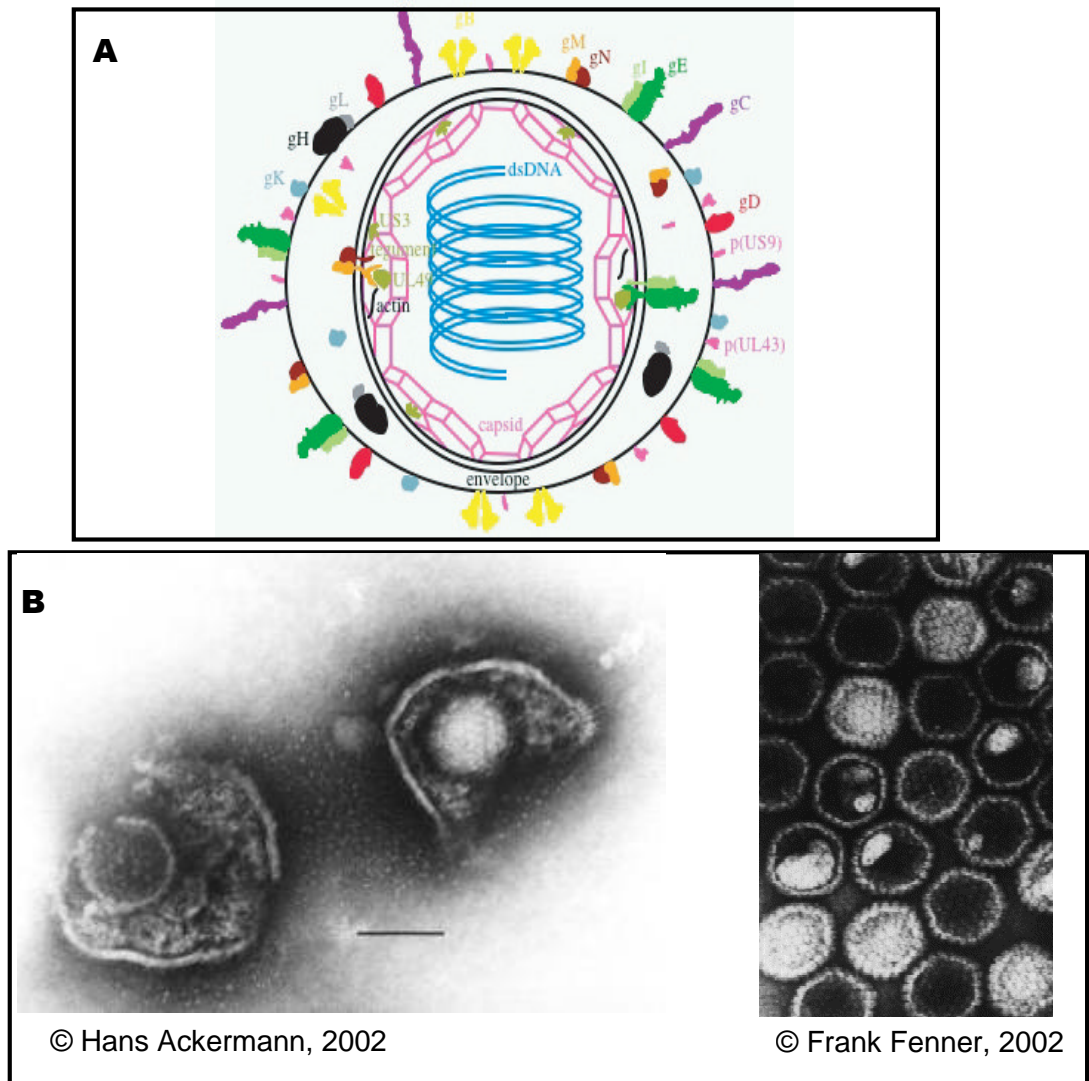


Figura 1. Morfología de los herpesvirus, A. Esquema representativo de la estructura de un virion de PRV, tomado de Nauwynck, 2007. **B.** Fotografías por microscopía electrónica.

Tanto el virion maduro como la partícula vírica infecciosa están compuestos, morfológicamente de 4 componentes estructurales.

1.1.1.1. “Core”

El “core” es la región central en la cual está contenida la doble cadena de DNA lineal del genoma del virus. (Mettenleiter, 2000).

1.1.1.2. Cápside icosaédrica

Es semejante a todos los herpesvirus. La cápside está conformada por 162 capsómeros (150 hexonas y 12 pentonas) (Newcomb et al., 1993). La cápside se forma rodeando una estructura de andamio (“scaffolding”) a la cual está anclada, pero la pierde con la incorporación del DNA genómico dentro de la cápside preformada (Mettenleiter, 2000).

1.1.1.3. Tegumento

Es una densa capa de estructura amorfa que se encuentra entre la cápside y la envoltura en una partícula de un herpesvirus maduro, está compuesto por más o menos 14 proteínas de origen vírico y de actina celular (Wong et al., 1997). Las proteínas del tegumento juegan un papel muy importante en la entrada del virus y en la morfogénesis del virión (Kopp et al., 2002, Mettenleiter, 2002).

1.1.1.4. Envoltura

Es una bicapa lipídica derivada de la membrana intracelular de vesículas en el área trans-golgi la cual contiene proteínas que en su mayoría son modificadas por adición de cadenas de carbohidratos, denominadas glicoproteínas que desempeñan su función en la unión a la célula, internalización, salida, esparcimiento a células contiguas, inducción de inmunidad protectora y evasión inmune (Nauwynck et al., 2007). El genoma de PRV codifica para 16 proteínas de membrana, de las cuales 11 son glicoproteínas, nombradas según la nomenclatura unificada para las glicoproteínas de los herpesvirus (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gK, gL, gM y gN). La gB forma un complejo homodimérico, y gE/gI, gH/gL tanto como gM/gN

forman presumiblemente complejos heterodiméricos. La gG no es constituyente de la envoltura pero es producida durante la infección. Existen otras proteínas de membrana no glicosiladas productos de los genes: UL20, UL43, US9 y posiblemente UL24. Todas las proteínas de la envoltura se encuentran también en la membrana de la célula infectada (Mettenleiter, 2000).

1.1.2. GENOMA

El genoma del PRV es una doble cadena de DNA lineal de 143.461pb (Klupp et al., 2004), consiste en dos únicas regiones: la corta y la larga (U_S y U_L), la región U_S está flanqueada por las secuencias interna y terminal repetidas (IR y TR, respectivamente) (Stevely, 1977) (**Figura 2**). Tiene tres orígenes de replicación: el OriL, localizado en medio de la región U_L y dos copias del OriS, localizadas en cada una de las regiones repetidas e invertidas. Aproximadamente la mitad de los genes de los *alfaherpesvirus* son considerados como no “esenciales”, son prescindibles para la replicación viral, por lo menos en cultivo celular (Mettenleiter, 2000).

La recombinación entre las regiones repetidas invertidas produce dos posibles isómeros del genoma con la región U_S en orientación opuesta, ambos isómeros son infecciosos y se encuentran en cantidades equimolares después de la infección (Ben-Porat & Kaplan, 1976).

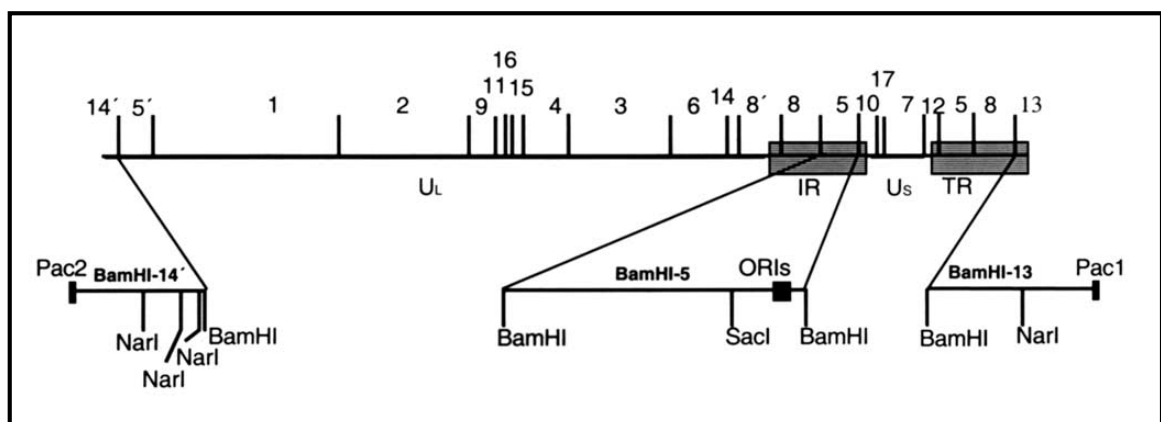


Figura 2. Esquema del genoma de PRV, tomado de Prieto et al., 2002.

1.1.3. CICLO REPLICATIVO

Al iniciar la infección el virus debe unirse a los receptores de la superficie celular. Después de la fusión de la envoltura con la membrana plasmática, la cápside sin envoltura es transportada a los poros nucleares, donde el DNA es liberado dentro del núcleo. La transcripción, replicación del DNA vírico y ensamblaje de las nuevas cápsides toman lugar en el núcleo (Roizman et al., 1993). La transcripción del DNA se realiza por la RNA polimerasa II celular e intervienen factores tanto celulares como víricos. La expresión de genes virales es altamente regulada. La mayor parte del DNA vírico es sintetizado por medio de un mecanismo de círculo rodante produciendo formas concatoméricas que son cortadas en monómeros y empaquetadas dentro de cápsides preformadas. El ensamblaje ocurre en fases; después del empaquetamiento del DNA en las cápsides, el virus madura y adquiere infectividad por fusión con la membrana nuclear interna. En células completamente permisivas el proceso entero tarda aproximadamente de 18 a 20 horas. Los diferentes pasos del ciclo de replicativo de PRV se visualizan en la **Figura 3**.

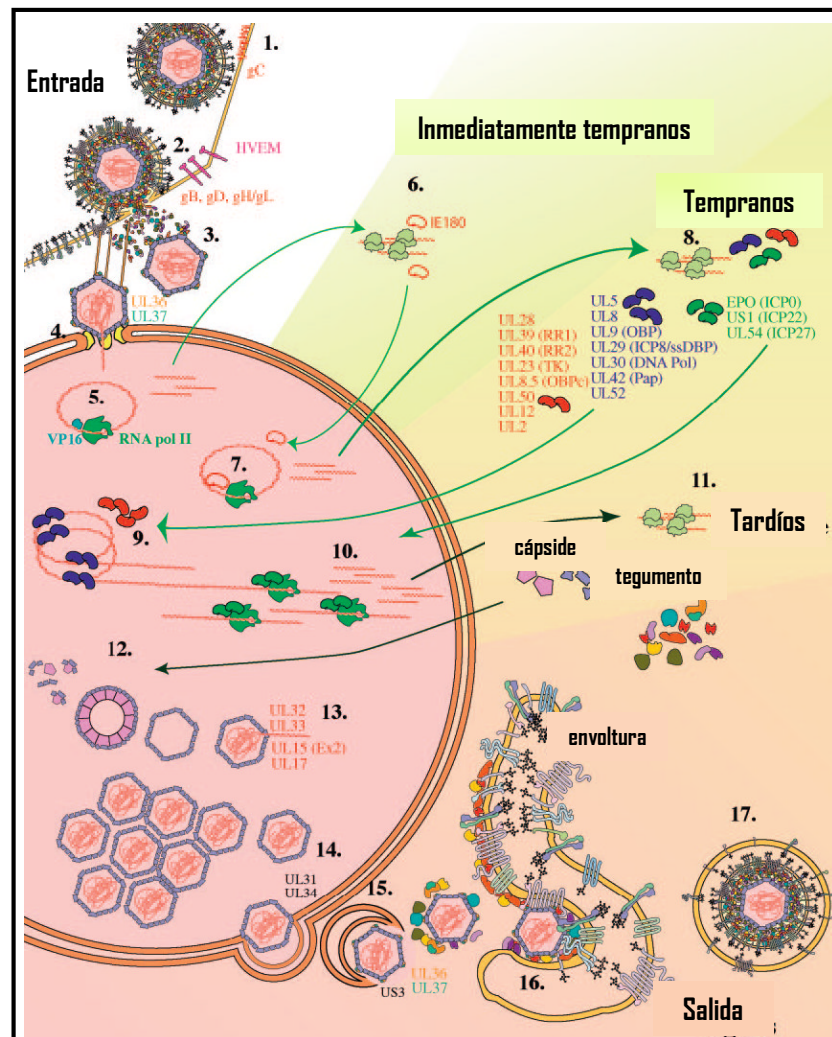


Figura 3. Esquema ciclo replicativo de PRV. Adaptado de Pomeranz et al., 2005.

1.1.3.1 Entrada

La entrada de los viriones de los herpesvirus a la célula requiere de una cascada de eventos mediados por las glicoproteínas virales (Spear & Longnecker, 2003). Los viriones de PRV primero se unen a las células por interacción de la gC con el heparan sulfato, en la matriz extracelular, entonces la gD se une a receptores específicos celulares para estabilizar la interacción virion-célula, finalmente la gB, gH y gL median la fusión entre la envoltura vírica y la membrana celular plasmática para permitir la penetración de la cápside viral y el tegumento en el citoplasma.

Se han identificado tres clases de receptores celulares implicados en la entrada de alfa herpesvirus (Spear & Longnecker, 2003):

- Mediador para la entrada de herpesvirus (HVEM), miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, que se expresa en una variedad de tipos celulares tales como linfocitos, células epiteliales y fibroblastos.
- Nectina 1 y nectina 2, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se expresan en una variedad de tipos celulares tales como células epiteliales, fibroblastos y neuronas. Especialmente la nectina 1 está altamente conservada entre las especies de mamíferos respecto a su estructura, función y relación con la entrada de alfa herpesvirus. PRV usa varias nectinas (humanas y animales) como receptores de entrada, además de otros receptores no identificados.
- Sitios específicos en heparan sulfato generados por isoformas de 3-O-sulfotransferasa.

Después de la penetración de la cápside y el tegumento en el citoplasma, las proteínas del tegumento se disocian de la cápside a lo cual sigue la fusión de la envoltura viral con la membrana celular plasmática, después de la fusión la cápside es transportada a los poros nucleares, donde el DNA genómico es liberado dentro del núcleo, allí rápidamente se circulariza en ausencia de síntesis de proteínas virales (Mettenleiter, 2000).

1.1.3.2 Expresión génica

La transcripción del DNA vírico ocurre en el núcleo y las proteínas víricas son sintetizadas en el citoplasma, la RNA polimerasa II del hospedador es la responsable de la transcripción de todos los genes víricos durante la infección. La expresión de proteínas víricas es regulada y secuencialmente ordenada en forma de cascada, por productos génicos expresados de manera coordinada y secuencial, dando lugar a tres fases claramente diferenciadas dentro del ciclo replicativo, denominadas como inmediatamente temprana (α), temprana (β) y tardía (γ) (Knipe et al., 2001). Los primeros en ser expresados son los genes inmediatamente tempranos (α) y se definen como aquellos que son expresados en ausencia de síntesis de proteínas celulares. Los genes

tempranos (β) no son expresados en ausencia de proteínas α competentes y participan en el metabolismo de ácidos nucleicos virales. Los genes tardíos (o genes γ) requieren de la replicación del DNA vírico para su eficiente transcripción y expresión, tienden a codificar proteínas necesarias para el ensamblaje de la cápside y la salida del virion de la célula (Pomeranz et al., 2005).

1.1.3.2.1 Genes inmediatamente tempranos (genes α)

Son expresados directamente después de la infección en ausencia de síntesis de otras proteínas *de novo*. Los productos de los genes inmediatamente tempranos usualmente funcionan como activadores de la cascada de transcripción, iniciadores de los mecanismos fisiológicos celulares requeridos para la infección vírica y como moduladores de la defensa antiviral del hospedador. La síntesis de polipeptidos α alcanza su pico más alto aproximadamente de dos a cuatro horas postinfección. PRV sólo tiene un gen inmediatamente temprano denominado IE180.

1.1.3.2.1.1. IE180 de PRV

PRV codifica solo para una proteína inmediatamente temprana, IE180 (homóloga a la ICP4 de HSV-1), en contraste con la mayoría de herpesvirus que expresan varias proteínas inmediatamente tempranas, por ejemplo HSV-1 codifica para cinco: RL2 (ICP0), UL54 (ICP27), RS1 (ICP4), US1 (ICP22), US12 (ICP47). PRV codifica para dos proteínas homólogas funcionalmente a la ICP0 y a la ICP27 de HSV-1, llamadas EP0 y proteína UL54 pero éstas son expresadas como tempranas (Huang & Wu, 2004). Los transcritos de la IE180 son detectados en extractos de células de riñón de conejo tratadas con cicloheximida (Ihara et al., 1983), apareciendo como pronto 30 minutos después de la infección. La proteína IE180 tiene 1460 aminoácidos (Cheung, 1989). Al igual que la ICP4 de HSV-1 el gen de la IE180 de PRV está presente en dos copias en el genoma, localizadas en las regiones repetidas IRS y TRS. Es un gen esencial para la replicación vírica en cultivo de tejido y

es requerido para la eficiente transcripción de los genes tempranos (Roizman, et al., 1993).

1.1.3.2.2. Genes tempranos (genes β)

Se caracterizan por ser expresados antes de la replicación del DNA, expresan proteínas cuya máxima tasa de síntesis es de cinco a siete horas después de la infección. Su transcripción es sensible a inhibidores de la traducción de proteínas tales como la cicloheximida. A este grupo pertenecen proteínas relacionadas con la síntesis de DNA, el metabolismo de los nucleótidos y además de proteínas necesarias para la activación de los genes tardíos. Existen dos grupos de polipéptidos: β_1 y β_2 , los genes β_1 , (ejemplo: reductasa ribonucleotida vírica) aparecen muy pronto después de la infección; los polipéptidos β_2 incluyen la timidina quinasa viral (TK) y la DNA polimerasa (Roizman, et al., 1993).

1.1.3.2.2.1. Timidina quinasa (TK)

Codificada por el gen (*UL23*) (Prieto et al., 1991) encontrado en las subfamilias *Alphaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae*. La TK es una enzima no esencial pero importante para la replicación de PRV en células diferenciadas tales como neuronas *in vivo* (Nauwynck et al., 2007). La TK fosforila nucleósidos de deoxipirimidina (un paso crítico en la síntesis de dTTP) y análogos de nucleósidos. Debido a que la timidina quinasa de HVS-1 tiene una más amplia especificidad de sustrato que la timidina quinasa de su célula hospedadora ha sido posible el desarrollo de análogos de nucleósidos, tales como el aciclovir o el ganciclovir, que pueden ser fosforilados en componentes antivirales. La TK de PRV posee un espectro de sustrato más limitado que la TK de HSV-1 (Maga et al., 1993).

Otra proteína expresada a niveles tempranos y en la cual hemos focalizado una parte de nuestros estudios es la glicoproteína gG.

1.1.3.2.2.2. Glicoproteína gG de PRV

Glicoproteína no esencial, anteriormente conocida como gX, excretada al medio de células infectadas por PRV. Es una proteína no estructural, que después de procesada tiene 95-kilodalton y su precursor 70-kilodalton. El mRNA de la gG de PRV codifica para 498 aminoácidos (según la cepa). El peso molecular estimado para la gG es de 53,700, más pequeño que la masa del precursor (70-kd) evidenciada en la traslación *in vitro*, esto puede ser debido al alto porcentaje de residuos de prolinas (8.8%) en la secuencia proteica (Rea et al., 1985). La gG es expresada bajo un promotor fuerte (Kovacs & Mettenleiter, 1991, Thomsen et al., 1987a) que ha sido caracterizado como un promotor temprano (Kovacs & Mettenleiter, 1991, Mettenleiter & Rauh, 1990, Thomsen et al., 1987a) y empleado para la expresión de genes foráneos tales como la EGFP (Jons & Mettenleiter, 1997), β -gal (Mettenleiter & Rauh, 1990) o luciferasa (Kovacs & Mettenleiter, 1991).

1.1.3.2.3. Genes tardíos (genes γ)

Se han dividido en dos grupos: γ_1 (ejemplo: genes específicos de las glicoproteínas B y D) los cuales son expresados relativamente temprano en la infección y son mínimamente afectados por los inhibidores de la síntesis de DNA, y en γ_2 (ejemplo: gen específico de la glicoproteína C) son expresados tardíamente en la infección y no son expresados en presencia de concentraciones efectivas de inhibidores de la síntesis de DNA vírico (Roizman, et al., 1993).

Después de la síntesis en el citoplasma, las proteínas de la cápside entran en el núcleo y forman la base para el ensamblaje de la cápside (Mettenleiter, 2000). Existen tres formas de cápsides intranucleares: con una estructura interna de andamio, sin esta estructura y con DNA (Mettenleiter et al., 1993).

1.1.3.3. Encapsidación y empaquetamiento

Los procesos de división y empaquetamiento son necesarios para el crecimiento de los herpesvirus, sin cualquiera de estos dos procesos no se

formaría progenie de virus infecciosa. En el virus herpes simplex, primero se forma una cápside cerrada, libre de DNA, y más tarde ésta se rellena con DNA, el ensamblaje de la cápside involucra la interacción de la proteína mayoritaria de la cápside con una proteína andamio no encontrada en el virión maduro (Homa & Brown, 1997).

En la replicación del DNA se produce la formación de un gran complejo concatomérico compuesto por un conjunto de repeticiones del genoma vírico, después este complejo concatomérico es dividido en monómeros cuando es empaquetado dentro de las cápsides preformadas (Ladin et al., 1980), rellenas primariamente con VP22a, la proteína andamio (Homa & Brown, 1997).

En PRV el gen UL28 (codifica para una terminasa ICP18.5) es requerido para la división y el encapsidación del DNA (Mettenleiter et al., 1993). Otras proteínas de PRV involucradas en el corte y empaquetamiento son: UL32, UL33 y UL17 (Klupp et al., 2005).

En herpes simplex el sitio específico de corte de las formas concatoméricas se encuentra en un único sitio con secuencias “a”, las cuales están presentes en las secuencias repetidas internas y en la parte terminal del genoma. Las secuencias “a” probablemente sirven como una medida para especificar cuando ha entrado en la cápside un equivalente a un genoma y cuando el DNA vírico debe ser cortado (Deiss et al., 1986). Dentro de las secuencias “a” existen dos motivos altamente conservados, que incluyen las señales necesarias para el corte del DNA en el sitio específico y su encapsidación, denominados secuencias *pac1* y *pac2* (McVoy et al., 1998).

En el genoma de PRV existen secuencias homólogas a los elemento *pac1* y *pac2* de las secuencias “a” de HSV (Rall et al., 1992). El dominio *pac1* tiene dos copias, una se encuentra en la porción UL proximal del IR y la otra cerca al extremo terminal del TR (*BamHI* 8' y 13) mientras que el domino *pac2* tiene sólo una copia que está en el extremo de la región UL (*BamHI* 14'),

(Harper et al., 1986, Rall et al., 1992). La secuencia *pac2* tiene dos regiones de 82 nucleótidos repetidas e invertidas, localizadas en el genoma del nucleótido 3 al 84 (región 1D) y la otra del nucleótido 442 al 523 (región 1R). En la **Figura 4** se observa la ubicación de las secuencias *pac* en el genoma de PRV.

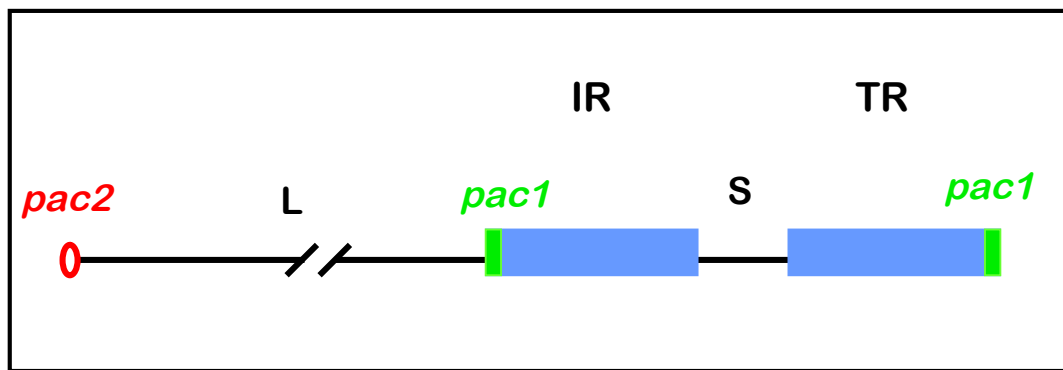


Figura 4. Ubicación de las secuencias *pac* en el genoma de PRV, "wild type". Adaptado de (Rall et al., 1992)

La proteína que reconoce las secuencias *pac* incluye una endonucleasa específica que libera una molécula de DNA completa del complejo concatémico. Se ha propuesto que el complejo formado por las secuencias *pac* en la región única corta (U_S) es reconocido por una proteína de la cápside. Existe un primer corte del DNA, después del cual una unidad completa del genoma es entonces introducido dentro de la cápside antes del segundo, y último corte del DNA. El proceso de empaquetamiento se resume en la **Figura 5**.

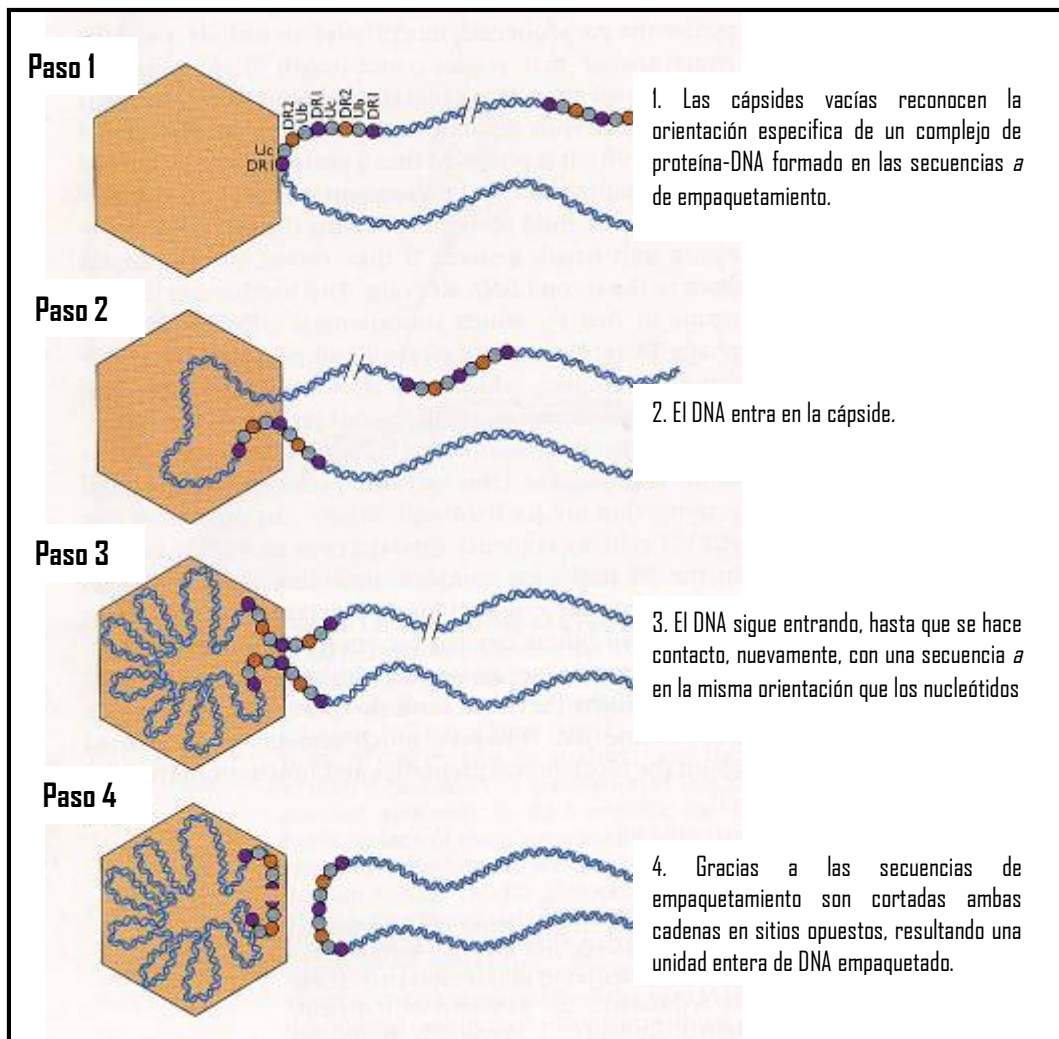


Figura 5. Proceso de empaquetamiento. Adaptado de Flint, et al., 2000.

1.1.3.4 Salida

Cuando la cápside está completa sale del núcleo por unión a través de la membrana nuclear interna. Primero aparece la envoltura aún con las glicoproteínas ausentes, además en el espacio perinuclear se empieza a formar el tegumento. Los viriones salen del espacio perinuclear por fusión de la envoltura primaria con la membrana externa del núcleo resultando en la liberación de cápsides en el citoplasma. Toma lugar un secundario proceso de envoltura en el área trans-golgi, donde el tegumento es incluido y la envoltura secundaria contiene las espículas (proyecciones que corresponden

a las glicoproteínas). Los productos del gen UL 3.5 son esenciales para este proceso. La partícula viral está dentro de una vesícula que se fusiona con la membrana citoplasmática para finalmente liberar la partícula viral al espacio extracelular (Mettenleiter, 2000).

1.2. ENFERMEDAD DE AUJESZKY

Enfermedad descrita por primera vez por Aládar Aujeszky en 1902, su hospedador natural es el cerdo, ocasionando grandes pérdidas económicas en la industria porcina a nivel mundial (Wittmann et al., 1980), pero además infecta un amplio rango de vertebrados (perros, gatos, pollos, mapaches, roedores, conejos, y raramente caballos) sin embargo no infecta a humanos ni a primates superiores (Enquist et al., 1998).

La forma de transmisión más importante es por vía aerógena, al inhalar aerosoles procedentes de granjas donde existen animales que excretan elevadas concentraciones de virus. También puede producirse la infección al ingerir pienso o agua contaminados con PRV, a través de fómites, o de manera directa por contacto oronasal o genital.

PRV tiene tropismo por el sistema respiratorio y el sistema nervioso, la replicación vírica primaria ocurre en la mucosa nasal y la orofaringe, las partículas virales entran a las terminaciones nerviosas sensoriales que inervan el epitelio mucoso infectado (Nauwynck et al., 2007). La morbilidad y mortalidad asociadas a la infección por PRV varía con la edad del cerdo, estado de salud del animal, cepa de virus y la dosis infecciosa. Los cerdos más jóvenes son los más severamente afectados y presentan los síntomas típicos de una infección del sistema nervioso central (**Figura 6**), en cerdos recién nacidos la mortalidad es del 100%, mientras que los cerdos mayores presentan síntomas respiratorios y la mortalidad suele ser menor del 2% (Pomeranz et al., 2005); en cerdas embarazadas generalmente conduce al aborto si la infección ocurre entre el segundo y tercer trimestre de embarazo.

Si los animales poseen inmunidad frente al PRV, esta sintomatología se ve reducida o incluso puede ser inaparente (Nauwynck et al., 2007).



Figura 6. Cerdo afectado por la enfermedad de Aujeszky

Una característica especial de los alfa herpesvirus es que tras un primer contacto con su hospedador, normalmente manifestado como una infección aguda, el virus establece una infección latente en el tejido nervioso y muy frecuentemente en las neuronas de los ganglios sensoriales más próximos a la puerta de entrada en el organismo. El PRV puede ocasionar infección latente en cerdos, alojándose predominantemente en los ganglios del trigémino. Se reactiva frecuentemente después de experiencias de estrés (transporte vehicular, enfermedad, parto) (Rziha et al., 1986).

Para el control de la enfermedad de Aujeszky se emplean vacunas vivas, algunas modificadas mediante ingeniería genética.

1.2.1. VACUNAS ATENUADAS FRENTE A PRV

Para poder garantizar el libre comercio de cerdos en Europa se han realizado muchos esfuerzos, con el fin de conseguir la erradicación de PRV, basados en estrategias de vacunación y diferenciación por medio de serología de los cerdos vacunados de los infectados. La mayoría de vacunas frente a

PRV son vacunas atenuadas. La atenuación puede producirse por la delección del gen UL23, el gen que codifica para la TK viral, indispensable para la replicación en tejidos no mitóticos, tales como neuronas (Coen et al., 1989, Tenser et al., 1981); se ha visto que mutantes de PRV defectivos en TK tienen reducida la virulencia, replicación en tejidos diana periféricos y la migración al sistema nervioso central (Ferrari et al., 2000).

Otra forma de atenuación también es mediada por delección de la gE ya que se disminuye la transmisión de célula a célula (Dingwell et al., 1994) y el esparcimiento neurológico (Mulder et al., 1994), sin alterar la producción vírica en cultivos celulares y además sin reducir la inducción de inmunidad protectora (Nauwynck et al., 2007). Históricamente cepas vacunales vivas atenuadas, tales como la cepa Bartha o la cepa Bucharest, surgen de sucesivos pases de aislados virulentos en cultivos de células embrionales de pollo. En las últimas décadas gracias al conocimiento genético y de la biología molecular de PRV se han podido esclarecer factores de neurovirulencia estableciendo que la gE es un importante factor en la neurovirulencia en cerdos (Mulder et al., 1994). La delección de la gE en cepas vacunales hace posible diferenciar serológicamente los cerdos infectados con los cerdos vacunados.

A nivel mundial las cepas vacunales preferidas son aquellas que son gE/TK negativas (Pomeranz et al., 2005), tales como la cepa Begonia, obtenida por selección con 5-bromodeoxiuridina.

En nuestro laboratorio se han obtenido los virus recombinantes gIS8 y gIP2 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004). El recombinante gIS8 es defectivo para la TK, gl, gE y 11K de PRV, el gIP2 se obtuvo a partir de dos isómeros del recombinante gIS8 por recombinación espontánea, siendo defectivo para la TK, gl, gE, 11K y 28K y tiene duplicado el gen PK. Lo cual hace que sean virus atenuados, que al ser defectivos para la gE puedan ser empleados como cepas vacunales e incluso como vector para vacunas multivalentes frente a varias enfermedades, al poder

introducirse genes de interés que confieran protección frente a determinadas enfermedades producidas por agentes patógenos (Férrandez et al., 1999).

1.3. TERAPIA GÉNICA

Definida como tratamientos curativos de enfermedades por medio de transferencia de material genético a las células. El gen transferido puede restaurar un déficit genómico específico al suplir una proteína no mutada o al potenciar/atenuar la expresión de un gen endógeno (Gardlik et al., 2005, Osten et al., 2007, Verma & Weitzman, 2005).

1.3.1. VECTORES EN TERAPIA GÉNICA

Un vector ideal debe permitir la eficiente liberación de transgenes específicamente a las células diana, después de una sola administración con mínima toxicidad celular y sistémica, mientras continua un deseado nivel de expresión por un tiempo específico. Para la liberación de genes existen vectores no virales y virales, dentro de los vectores virales existen dos sistemas: amplicones y virus recombinantes.

1.3.1.1. Amplicones

Unos de los vectores virales más comúnmente empleados son los derivados de HSV-1 (Bowers et al., 2001, Burton et al., 2002a, Burton et al., 2002b, Kanai et al., 2006, Kim et al., 2005, Toda et al., 2002).

Los amplicones de HSV-1 son definidos como vectores de DNA que emplean dos elementos no codificantes de HSV-1 y necesarios para la replicación del amplicón: el origen de replicación (Ori) y las secuencias de empaquetamiento (*pac*) además del transgen de expresión, todo esto contenido dentro de un plásmido facilitando la creación de construcciones recombinantes y permitiendo que los amplicones de HSV-1 sean incorporados dentro de los viriones del virus (Frenkel, 2006, Oehmig et al., 2004b).

El empaquetamiento es permisivo en el sentido que los viriones pueden incorporar concatenados de DNA de amplicón de 5 a 75 kpb, lo cual permite no solo la inserción de un loci genómico entero, sino la adición de varios elementos tales como promotores, sistemas inducibles para regular la expresión génica, marcadores génicos para mejorar la visualización de proteínas de fusión o las células transducidas (Frenkel, 2006, Winkeler et al., 2007).

Aunque los vectores virales derivados de HSV-1 son ampliamente empleados, tienen como desventaja la posibilidad de recombinar con virus endógenos generando virus replicativos competentes portando transgenes. El sistema de amplicones libres de virus reduce la toxicidad, las reacciones inmunes a proteínas del virus y el potencial de recombinación. Este sistema se basa en la utilización de cosmidos o BACs que codifican el genoma entero del HSV-1 pero con las secuencias *pac* delecionadas, capaces de generar el ciclo vírico después de la cotransfección. Al cotransfectar células con los cosmidos o BACs (con las secuencias *pac* delecionadas) junto con el amplicón de DNA, hay replicación y empaquetamiento del amplicón con una mínima contaminación de virus cooperador (Oehmig et al., 2004b, Prieto et al., 2002). Existiendo por lo tanto el riesgo de recombinación con virus endógenos, ya que PRV no produce patología en humanos (Enquist et al., 1998) es un candidato idóneo para ser empleado como vector en estrategias de terapia génica.

1.3.1.1.1. BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

Sistema basado en el plásmido de la fertilidad de *E. coli* (plásmido F), desarrollado para insertar grandes cantidades de DNA. Naturalmente, el plásmido F es mantenido en bajos números de copia en las células (una ó dos copias por célula), lo que reduce el potencial de recombinación entre los fragmentos de DNA incorporados en el plásmido. El plásmido F es capaz de mantener, de una forma estable, fragmentos insertados de DNA hasta de 350kpb (Narayanan et al., 1999, Orford et al., 2000, Shizuya et al., 1992).

Básicamente un BAC debe incluir genes, del plásmido F, que controlen la regulación unidireccional de la replicación (*OriS* y *repE*) y que mantengan el nivel de números de copia entre uno y dos por genoma de *E. coli* (*parA* y *parB*), además del gen de resistencia a cloramfenicol y de un segmento para el clonaje (Shizuya et al., 1992).

Se han desarrollado BACs con el genoma completo de PRV con ventajas tales como que conservan la capacidad de infectar y poseen la estabilidad del sistema BAC (Smith & Enquist, 1999, Smith & Enquist, 2000). Estos BACs son una herramienta útil para el estudio de patogénesis en herpesvirus y para ser empleados como virus cooperadores para los amplicones.

1.3.1.2. Virus recombinantes

Los virus recombinantes son creados al reemplazar genes virales no esenciales por un transgen de interés, de hasta 50 kpb, en diferentes sitios en el genoma del virus.

Estos vectores virales recombinantes pueden ser usados como virus cooperador para los amplicones proporcionando componentes únicos y complementarios para la liberación de genes (Oehmig et al., 2004b). Además pueden ser usados como vectores vacunales (Peeters et al., 1997, Tian et al., 2006, Weigel et al., 2003, Yin et al., 2007) pudiendo ser obtenidos al reemplazarles genes requeridos para la replicación lítica e involucrados en citotóxicidad, mientras conservan el establecimiento de la latencia y previenen la reactivación. Otra aplicación de los virus recombinantes es como agentes oncolíticos, empleados en la terapia del cáncer y son definidos como virus que presentan selectividad por células tumorales, ya sea de forma intrínseca o por manipulaciones de ingeniería genética, con el fin de lisarlas o de conducir transgenes terapéuticos dirigidos por promotores específicos tumorales (Song et al., 2006, Terada et al., 2006).

1.3.2. PRV COMO VECTOR EN TERAPIA GÉNICA Y AGENTE ONCOLÍTICO

PRV puede ser un vector eficiente y seguro para usar en nuevas estrategias terapéuticas en humanos (Boldogkoi & Nogradi, 2003), ya que tiene la capacidad de infectar células específicas y transferir genes foráneos con aceptable eficiencia pero es incapaz de causar enfermedad en humanos (Enquist et al., 1998) sin embargo PRV si puede infectar células humanas *in Vitro* (Férrandez et al., 1999, Sawitzky, 1997) e *in vivo* (Sawitzky, 1997). Dado que no hay inmunidad pre-existente en humanos, que pueda originar anticuerpos neutralizantes ni hay riesgo de contaminación con PRV latente, puede tener importantes ventajas frente a los virus herpes simplex, empleados comúnmente en protocolos de terapia génica (Boldogkoi & Nogradi, 2003, Oehmig et al., 2004a, Prieto et al., 2002).

PRV naturalmente puede producir infección latente, por lo tanto no destruye la célula hospedadora (Osorio & Rock, 1992). De los promotores de latencia LAP1 y LAP2 no se conocen homólogos en HSV-1 lo que lo hace potencialmente utilizable para dirigir la expresión estable de genes foráneos (Boldogkoi & Nogradi, 2003).

Es un virus que crece bien y es fácil de manipular en el laboratorio, además su manipulación no conlleva a riesgos para el personal del laboratorio. El DNA purificado es infeccioso y las técnicas para remplazar y manipular sus genes están bien establecidas ya que tiene un genoma muy largo, con muchos genes accesorios que pueden ser reemplazados por genes foráneos.

Al infectar gran variedad de animales puede ser utilizado en múltiples modelos: en su huésped natural el cerdo o en otros modelos como ratas, ratones, conejos, etc.

Entre las aplicaciones que se le han dado al PRV se encuentran:

- Ha sido empleado como vector de expresión de genes marcadores, que permiten detectar las células infectadas o que permiten la visualización no destructiva de células transducidas, tales como la luciferasa (Kovacs & Mettenleiter, 1991) o la EGFP (Boldogkoi et al., 2002, Imnaten et al., 2001, Jons & Mettenleiter, 1997, Smith et al., 2000).

- Usado como trazador trans-sináptico: muchos virus pueden infectar células del sistema nervioso, pero solo algunos tienen la capacidad de esparcirse entre las uniones sinápticas de las neuronas: virus de la estomatitis vesicular (Lundh, 1990) virus de la rabia (Kelly & Strick, 2000), alfa herpesvirus (Enquist et al., 1998), entre otros. Ya que PRV posee características como: esparcimiento trans-sináptico, auto amplificación (genoma viral encapsidado y luego transportado a sitios cercanos de contacto sináptico o a neuronas de segundo orden, donde vuelve a ocurrir replicación) y un amplio rango de hospedadores, se han realizado varios estudios usando a PRV como trazador en diferentes modelos animales tales como cerdo (Mulder et al., 1996), perro (Chien et al., 1998), ratones (Brittle et al., 2004, Kerman et al., 2006).

- PRV ha sido usado como vector de expresión de genes con potencial efecto terapéutico por ejemplo expresando la proinsulina (Prieto et al., 2002).

- Ha sido también aprovechada la capacidad de destruir células tumorales empleado como virus oncolítico, es decir un virus o virus recombinante que tiene la capacidad de destruir selectivamente las células tumorales mientras el tejido normal no se ve afectado. Se ha empleado en estudios de cáncer de vejiga con resultados satisfactorios (Shiau et al., 2007), en estudios con células de glioblastoma donde se concluye que éstas son premisivas para PRV (Wollmann et al., 2005), en modelo ratón se ha comprobado que puede destruir neuroblastoma, glioblastoma y hepatoma (Boldogkoi et al., 2002).

- Utilizado como vector vacunal polivalente, donde la vacunación confiere protección no sólo a la enfermedad inducida por PRV si no también frente a otros agentes infecciosos. Se han realizado virus recombinantes de PRV expresando proteínas del virus reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) (Jiang et al., 2007), co-expresando una proteína del parvovirus porcino y un precursor de una proteína del FMDV (foot-and-mouth-disease- virus) (Hong et al., 2007), expresando una proteína del virus de la encefalitis japonesa (Xu et al., 2004).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido dirigidos para contribuir al desarrollo y la utilización del virus de la Pseudorrabia como vector de expresión en vacunas y terapia génica. Hasta ahora se han utilizado virus recombinantes para la expresión de proteínas foráneas bajo el promotor gG del virus. En esta Tesis queremos analizar el promotor gG en virus recombinantes y ampliar la aplicación del virus como vector con el uso de amplicones. Para conseguir este fin hemos llevado a cabo los siguientes objetivos:

1. Expresar la EGFP como proteína marcadora bajo el promotor gG de PRV.
2. Determinar la expresión génica inducida por el promotor gG de PRV.
3. Estudiar la regulación de la expresión del promotor gG de PRV por medio de plásmidos, amplicones y virus recombinantes.
4. Construcción de BACs de PRV como posibles agentes cooperadores en la obtención de amplicones libres de virus.
5. Analizar funcionalmente las secuencias *pac* mediante BAC de PRV.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y MEDIOS DE CULTIVO

3.1.1.1. Líneas celulares

- **VERO:** Células epiteliales de riñón de mono (ATCC CCL 81). Su mantenimiento se realizó en medio DMEM suplementado con 5% de suero de ternera fetal.

- **293-T:** Línea celular altamente transfectable por fosfato cálcico, derivada de la línea celular 293 (ATCC CLR 1573), línea celular de riñón embrionario humano, a las cuales se les insertó el antígeno T del virus SV40. Su mantenimiento se realizó en medio DMEM suplementado con 10% de suero de ternera fetal.

- **E5:** Células Vero que expresan la ICP4 de HSV-1 (DeLuca et al., 1985).

3.1.1.2. Virus

3.1.1.2.1. Virus de la Pseudorrabia: Cepas

- **NIA-3:** Cepa virulenta de PRV (McFerran & Dow, 1975).

- **Becker:** Aislado virulento de PRV y cepa parental de los BACs (Bacterial Artificial chromosome) usados en este estudio (Smith & Enquist, 1999) y además fue empleado como virus cooperador en experimentos con amplicones, cedido por L. Enquist (Universidad de Princeton).

-**gIS8**: Virus recombinante, obtenido previamente en el laboratorio, es negativo en gI, gE y el gen de 11K; expresa la TK de HSV-1 bajo el promotor $\alpha 4$ (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004). Empleado en este estudio como cepa parental de los virus recombinantes y además como virus cooperador en experimentos con amplicones.

3.1.1.3. Cepas de *E. coli*

- **Cepa DH5 α** (Hanahan, 1983). Cepa con recombinación deficiente usada para el crecimiento de plásmidos. Producen α -complementación con el extremo amino de la β galactosidasa codificado por algunos plásmidos como los pUC.

- **Cepa DH10 B** (Lin et al., 1992). Cepa con recombinación deficiente usada para la propagación de los BACs. Facilita el clonaje de DNA genómico metilado y además facilita la estabilidad de plásmidos grandes.

- **Cepa BL21 (DE₃) pLysS**. Cepa usada para la expresión de genes clonados en vectores de expresión bajo el control del promotor T7. Expresa la RNA polimerasa del fago T7 de forma constitutiva, bajo el control de un promotor inducible por IPTG, contiene el plásmido pLysS, portador del gen de resistencia a CAF y el gen codificante de la lisozima, que al expresarse, inhibe la producción basal de la RNA polimerasa del fago T7. La presencia de este plásmido aumenta la tolerancia de esta cepa a plásmidos portadores de genes cuyos productos sean tóxicos y favorece la lisis celular para la purificación proteica (Studier, 1991).

3.1.1.4. Medios de cultivo

3.1.1.4.1. Medios para cultivos celulares

Las líneas celulares eucariotas fueron cultivadas en medio mínimo esencial - modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco™ Invitrogen), suplementado con suero de ternera fetal (STF), en concentraciones adecuadas para cada tipo celular, y con las siguientes concentraciones de

antibióticos: 100 U.I./ml de penicilina, 0,05 mg/ml de estreptomicina, 0,05 mg/ml de sulfato de gentamicina y 1 µg/ml de anfotericina B. Tamponado con bicarbonato al 0,15% y HEPES 15mM.

Todos los tipos celulares se crecieron en frascos Falcon®, Becton Dickinson, con una superficie de 12,5, 25, 75 o 150 cm² a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂.

3.1.1.4.2 Medios para cultivos bacterianos

Para su crecimiento, las cepas de *E. coli* se cultivaron a 37°C durante 16 horas en medio Luria Bertani (LB) estéril: 10 g/l de Bacto™ triptona (BD), 5 g/l de Bacto™ Extracto de levadura (BD), 5 g/l de ClNa, 1 g/l de glucosa, en agua desionizada, ajustando el pH a 7 con NaOH 2N.

3.1.2. PLÁSMIDOS

3.1.2.1. Vectores de clonaje

- **pUC18:** Plásmido que se caracteriza por replicar produciendo un alto número de copias, expresa el fragmento aminoterminal de la β-galactosidasa produciendo α-complementación con las cepas bacterianas adecuadas, pudiendo identificar los plásmidos recombinantes. Además expresa el gen de resistencia a ampicilina.

- **pGEM-T:** Plásmido comercial de Promega, utilizado para el clonaje de productos de PCR al tener en sus extremos 3' timidinas que se complementan con los extremos del producto amplificado por PCR mediante la Taq DNA polimerasa. Contiene los promotores de la RNA polimerasa de los fagos T7 y SP6 que flanquean el sitio de clonaje múltiple dentro de la región que codifica el α-péptido de la enzima β-galactosidasa que sirve de indicador en la selección de recombinantes por el color de las colonias.

- **pRSET**: Plásmido comercial suministrado por Invitrogen, diseñado para la expresión y purificación de altos niveles de proteínas de genes clonados en *E. coli*, estos altos niveles de expresión son debidos al promotor T7. En el extremo 5' amino terminal existe un bloque de 6 histidinas (para favorecer la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad), una secuencia estabilizante del transcrito, además de un sitio de reconocimiento para enteroquinasa que sirve para, después de purificar la proteína, eliminar el péptido N-terminal.

- **pCDNA3**: Plásmido suministrado por Invitrogen, que facilita el nivel de expresión de cDNAs en células de mamífero. Tiene el origen de replicación del bacteriófago F1 para síntesis de una sola cadena de DNA en *E. Coli*, origen de replicación en *E. Coli*, sitio de clonaje múltiple, promotor T7 el cuál permite la transcripción “*in vitro*” del DNA foráneo. La expresión de la proteína es dirigida por el promotor de CMV. El plásmido confiere resistencia a la ampicilina.

- **pUC4K**: Plásmido suministrado por Amersham Biosciences, contiene la región codificante del gen de la kanamicina.

- **pBR322**: Plásmido que se caracteriza por replicar produciendo un número bajo de copias, contiene el gen que codifica para la β -lactamasa lo cual confiere resistencia a la ampicilina y el gen que confiere resistencia a la tetraciclina.

3.1.2.2. Otros plásmidos

- **pEGFP-N1**: Plásmido comercial suministrado por Clontech, que codifica la EGFP, una variante de la GFP (“green fluorescent protein”), que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y una expresión más alta en células de mamíferos. El sitio de clonaje múltiple está entre el promotor inmediatamente temprano de CMV y las secuencias que codifican la EGFP. Contiene el origen de replicación de SV40, un origen de replicación en *E. coli* y genes de resistencia a neomicina y a kanamicina.

3.1.2.3. Amplicones

- **pORI-PAC:** Contiene el origen S de replicación de PRV (OriS) y las secuencias de empaquetamiento *pac1-pac2* del virus de la Pseudorrabia, clonados en el pUC18 (Prieto et al., 2002).

3.1.3. ENZIMAS

- RNasa: Ribonucleasa A (Sigma)
- Klenow Fragment DNA polimerasa I (Biolabs)
- T4 DNA ligasa (Biolabs)
- Fosfatasa Alcalina: Shrimp alkaline phosphatase (USB)
- Endonucleasas de restricción: Suministradas por Biolabs, Roche y Amercham Biosciences.
- Proteinasa K (Roche).

3.1.4. PRODUCTOS Y REACTIVOS

3.1.4.1. Antibióticos

Ampicilina (Sigma)
Kanamicina (Sigma)
Cloramfenicol (Sigma)
Tetraciclina (Sigma)

3.1.4.2. Anticuerpos

ANTI-GFP (BD Biosciences Clontech)
ANTI-Actina (Lab Vision corporation)
Conjugados: Proteína A peroxidasa (Sigma), IgG anti-conejo marcado con peroxidasa (Amersham Biosciences), anti-mouse whole molecule peroxidasa conjugate (Sigma).

3.1.4.3. Colorantes

Azul Brillante de Coomassie (Serva).

3.1.4.4. Electroforesis

Acrilamida (Merck)

Bisacrilamida: Bis N,N' -metilen bis-acrilamida (BioRad)

DATD: N,N' Dialiltartardiamida (BioRad)

TEMED: N,N,N,N' – tetrametilnediamina (BioRad)

β -Mercaptoetanol (BioRad)

Marcadores de peso molecular para geles de proteínas: SDS-PAGE Standards Broad range y marcadores preteñidos: SDS-PAGE Standards Broad Range (Bio-Rad).

Agarosa: SeA KeM®, LE Agarose (Cambrex)

Agarosa de bajo punto de fusión: Seaplaque®, agarose (Cambrex)

Agarosa gold: SeaKem®, Gold Agarose (Cambrex)

Marcador de tamaño molecular para DNA: 1Kb PLUS DNA LADDER (Invitrogen™) a una concentración de 100ng/ μ l

Azul de bromofenol (BioRad)

Bromuro de etidio (Serva).

3.1.4.5. Inhibidores

Cicloheximida (Sigma)

Ácido Fosfonoacético (Sigma)

Actinomicina D (Sigma)

Ganciclovir (Sigma)

TLCK (Roche).

3.1.4.6. Productos radiactivos

α 32 P-dCTP (New England nuclear).

3.1.4.7. Otros reactivos

IPTG: Isopropil β -D-1-tiogalactosidasa (Promega).

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galacto-pyranoside (Promega).

Sephadex G-50 (Pharmacia)

ECL™ Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences RPN 2106 y RPN 2135)

DMSO (Dimetil sulfóxido, Sigma)

dNTP (4) (10Mm) (Applied Biosystems)
Revelador rayos X (Sakura)
Fijador (Sakura)
Cloroquina (Sigma)
Aduvante completo e incompleto de Freund (Sigma)
O- phenylendiamina (OPD) (Sigma)
Esperma de Salmón (Sigma)
Agar noble (DIFCO)
Formaldehído (Sigma).

3.1.4.8. Software

1D IMAGE TDI™.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. CULTIVOS CELULARES Y CONSERVACIÓN

El mantenimiento de todas las líneas celulares se realizó mediante pases sucesivos, una vez éstas alcanzaban una confluencia del 100%, la monocapa se lavaba con PBS 1X, se desprendía con tripsina (Gibco™, Invitrogen)-EDTA y se resuspendía en medio de cultivo DMEM. Parte de estas células se sembraban en medio fresco para continuar el cultivo, la concentración celular dependía del tipo celular y de las necesidades.

Las células se conservaron mediante criogenización en criotubos estériles de 2ml (Corning® Incorporated), en medio de cultivo con el crioprotector dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma) al 10%, a una concentración de 4×10^6 células/ml. Congeladas primero a -70°C por 24 horas para finalmente ser conservadas en nitrógeno líquido (-196°C).

3.2.2. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS

3.2.2.1. Transfección por precipitación con fosfato cálcico

Las células 293-T fueron transfectadas por precipitación con fosfato cálcico (Abad et al., 2002), método bioquímico cuyo principio es que el DNA a transfectar se mezcla con CaCl_2 y buffer fosfato formando un precipitado de fosfato cálcico que posteriormente entrará a la célula por endocitosis. La monocapa de células con una confluencia del 70-80% se trató 25 μM de cloroquina (Sigma) por 5 minutos, luego se agregaron 10 μg del plásmido de interés en una mezcla de: CaCl_2 204 mM, 2x HBS (NaCl 274mM, HEPES 50 mM, Na_2HPO_4 1.5mM, pH 7.0), se cambió el medio ocho horas después y se continuó la incubación de 48 a 72 horas (Abad et al., 2002).

3.2.2.2. Transfección por lipofectamina

Se basa en la formación de complejos entre lípidos catiónicos y DNA. El complejo tiene afinidad por la membrana celular lo que permite la entrada del DNA en el citosol.

Las células Vero fueron transfectadas con Lipofectamina 2000 (Invitrogen). La monocapa de células, con una confluencia del 80%, se trató con 4 μg de DNA y con 10 μl de lipofectamina 2000 por un tiempo de 5 horas, después de las cuales se cambió el medio por medio fresco y se continuó la incubación durante 48 a 72 horas.

3.2.2.3. Transfección por FuGENE

Es un reactivo compuesto de una mezcla de lípidos y otros componentes que forman un complejo con el DNA y lo transportan dentro de las células (Jacobsen et al., 2004).

Las células Vero son transfectadas con FuGENE 6 Reaction (Roche Applied Science) cuando la monocapa tenía una confluencia del 80%, se trató con 1 μg de DNA y 3 μl de FuGENE 6 (previa incubación de 45 minutos) por 6 horas, después de las cuales se suplementó el medio con suero y antibióticos, se continuó la incubación por 48 o 72 horas más.

3.2.3. PRODUCCIÓN Y CONSERVACIÓN DE VIRUS

Para la producción de inóculos víricos se utilizaron cultivos de células Vero. Los cultivos celulares se realizaron siguiendo las técnicas descritas anteriormente (apartado 3.2.1). Las cepas víricas se multiplicaron en frascos de cultivo (Falcon®, Becton Dickinson) de 75cm² de base, que contenían 15ml de medio de cultivo DMEM (Gibco™, Invitrogen) suplementado con 5% de suero de ternera fetal (STF) y antibióticos.

Para la preparación del “stock” vírico, monocapas subconfluentes de estas células fueron infectadas con los virus a una multiplicidad de infección (M.O.I) de 0,1 u.f.p/cél. El inóculo vírico se dejó en preadsorción en 3ml de medio durante 90 minutos, tras lo cual se añadió medio de cultivo hasta 15ml, se incubó a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂. Cuando se observó un efecto citopático total, aproximadamente 48 horas, las células se desprendieron y se suplementaron con una concentración final de STF del 20%, posteriormente se congelaron a -70°C y descongelaron a 37°C, luego se sonicaron en el sonicador de baño (Branson® 2210) a 10°C durante 15 minutos para favorecer la rotura celular y la disgregación de cúmulos, a continuación se centrifugaron a 6000 xg, durante 10 minutos a 4°C, para retirar los restos celulares, finalmente se recogió el sobrenadante y se alicuotó en tubos tapa rosca de 2ml para su posterior conservación a -70°C.

3.2.4. TITULACIÓN VÍRICA

La titulación vírica fue realizada por dosis infecciosa 50 en cultivos de tejidos (DICT₅₀). Para ello se realizaron diluciones seriadas en base 10 del virus a titular, utilizando DMEM (Gibco™, Invitrogen) suplementado con 5% de suero y antibióticos, se inocularon 50µl de cada dilución, por quintuplicado en placas de 96 pocillos (Falcon®, Becton Dickinson), previamente sembradas con 20.000 células Vero /pocillo en un volumen 100µl de medio DMEM (Gibco™, Invitrogen) suplementado al 5% con suero de ternera fetal y antibióticos. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48

horas, tras las cuales se observó la aparición de efecto citopático (EC) de los virus al microscopio (Nikon TMS). En función de la ausencia o presencia de EC se calculó el título siguiendo el método de Reed-Muench (Reed y Muench., 1938) y se expresó como DICT₅₀/ml.

3.2.5. OBTENCIÓN DE VIRUS RECOMBINANTES

Para obtener virus recombinantes se hacía una transfección inicial en células Vero, con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como se describe en el apartado 3.2.2.2. Cuando se observaba EC, aproximadamente 48 horas después de la transfección, las células se congelaban a -70°C y se descongelaban a 37°C para luego ser sonicadas durante 15 minutos en baño (BranSonic®) y finalmente ser alicuotadas en tubos tapa rosca de 2ml. A partir de este inóculo se obtuvieron clones seleccionados con Ganciclovir (Sigma) por plaqueo en células Vero en presencia de agar noble (DIFCO) al 0,8%.

Para realizar los plaqueos, el día anterior, se sembraban placas p6 (Falcon®, Becton Dickinson) con 2ml de medio DEM + 5% STF con 150.000 cél/ml, la adsorción se realizaba con 500µl de DMEM (Gibco™, Invitrogen) al 5% de STF más 25 µg/ml de Ganciclovir (Invitrogen) y con 500 µl de diluciones en base diez del inóculo vírico durante 90 minutos a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo se retiró el inóculo y se añadieron 3ml de DMEM suplementado con 25 µg/ml de Ganciclovir (Invitrogen), y agar noble (DIFCO) al 0,8%, se incubaron durante 48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂, tras las cuales se picaron focos aislados en las máximas diluciones. Estos focos fueron puestos en 500µl de DMEM (Gibco™, Invitrogen) suplementado con STF al 20% y posteriormente fueron seleccionados por dos plaqueos sucesivos más.

Finalmente se escogían como virus recombinantes aquellos que tenían un título más alto (apartado 3.2.4) y se realizaba un “Stock” vírico (apartado 3.2.3) para tener mayor concentración y su posterior conservación.

3.2.6. CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE BACTERIAS

Las bacterias transformadas con plásmidos fueron seleccionadas por su crecimiento a 37°C durante 16 horas en medio LB sólido (LB, Bacto™ agar-BD- 15g/l) en presencia de la concentración adecuada del antibiótico frente al que presentan resistencia (plásmidos: ampicilina 100µg/ml, tetraciclina 10µg/ml, kanamicina 50µg/ml, cloramfenicol 50µg/ml; BACs: tetraciclina 3µg/ml, kanamicina 15µg/ml, cloramfenicol 15µg/ml) (Sambrook y Russell, 2001). Los clones que crecían selectivamente se amplificaban creciendo una colonia aislada de la placa en medio LB líquido, en las condiciones descritas anteriormente.

Para su conservación las bacterias transformadas con plásmidos, se mantuvieron congeladas a -70°C en glicerol estéril al 40%.

3.2.7. TRANSFORMACION DE BACTERIAS

3.2.7.1. Preparación de células competentes

Para preparar las bacterias competentes éstas se crecieron en medio LB estéril y sin antibióticos a 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica_{600nm} de 0.4-0.5, después de lo cual se incubaron en hielo entre 15 y 30 minutos, se centrifugaron a 6000 xg, a 4°C durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó y el sedimento de células se lavó en agua desionizada y destilada estéril. Este proceso se repitió dos veces, tras lo cual se efectuó un último lavado en glicerol estéril al 10%, se centrifugó a 6000xg durante 10 minutos y finalmente las células se resuspendieron en glicerol al 10% a una concentración aproximada 3×10^{10} cél/ml, se alícuotaron y se congelaron a -70°C hasta su uso.

3.2.7.2. Transformación de células procariotas por electroporación

Es la introducción de DNA en bacterias por medio de descargas eléctricas que producen poros en la pared y la membrana plasmática lo suficiente para que entren las moléculas de DNA del medio (Wong & Neumann, 1982). La transformación se hizo siguiendo las recomendaciones

de la casa comercial del electroporador MicroPulser de Bio Rad, empleando cubetas con un diámetro de 1mm (Cells Projects).

Las células competentes se descongelaron en hielo, posteriormente se les añadió la suspensión del DNA a una concentración aproximada de 50ng o 300ng, para plásmidos o BACs respectivamente, se incubaron durante un minuto, transcurrido dicho tiempo, las células se sometieron a un pulso eléctrico de 1,8KV, 25 μ F y 200 Ω m; inmediatamente después las células se resuspendieron en medio SOC (MgSO₄ 10mM, MgCl₂ 10mM, glucosa 20mM, Bacto™ triptona al 2% (BD), Bacto™ extracto de levadura al 0,5% (BD), NaCl 10mM, KCl 2,5 mM) y se incubaron durante una hora a 37°C en agitación constante. Transcurrido este tiempo las células se sembraron en el medio de selección adecuado (LB sólido con el respectivo antibiótico).

3.2.8. AISLAMIENTO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.2.8.1. Aislamiento de DNA vírico

El DNA vírico se aisló y purificó por centrifugación en gradiente de densidad de ioduro sódico (INa) de las células infectadas (Walboomers & Schegget, 1976), cuyo principio es que el bromuro de etidio y el DNA vírico son mezclados con una solución de INa a una densidad de 1,434; cuando la mezcla es centrifugada a alta velocidad, la fuerza centrífuga genera un gradiente de densidad. Durante la formación del gradiente, el DNA de diferente densidad migra a una posición en el tubo en la cual su densidad es igual a la de la solución de INa y puede ser visualizado por la presencia del bromuro de etidio (Serva).

Las células infectadas se centrifugaron a 2000 rpm por 10 minutos, el sedimento se lavó con 50ml de PBS, se centrifugó 5 minutos a 2000rpm, se resuspendió en EDTA 0,01 M/TE. Fue lisado con 425 μ g/ml de proteinasa K y las proteínas desnaturalizadas con 0,425% de SDS incubando a 37°C toda la noche. El índice de refracción de la muestra se ajustó a 1,434 y finalmente se

añadieron 4µg/ml de bromuro de etidio. Se ultracentrifugó (optima™ TLX, Beckman) a 80K por 20 horas a 25°C, a continuación se extrajo la banda inferior de DNA con ayuda de una aguja y bajo luz U.V a 300nm (**Figura 7**), dicho DNA se lavó 3 veces con alcohol isoamílico saturado, para eliminar el bromuro de etidio, y finalmente se dializó con TE (tris-EDTA) durante tres días, la concentración del DNA se analizó mediante electrofóresis en gel de agarosa al 0,75%.

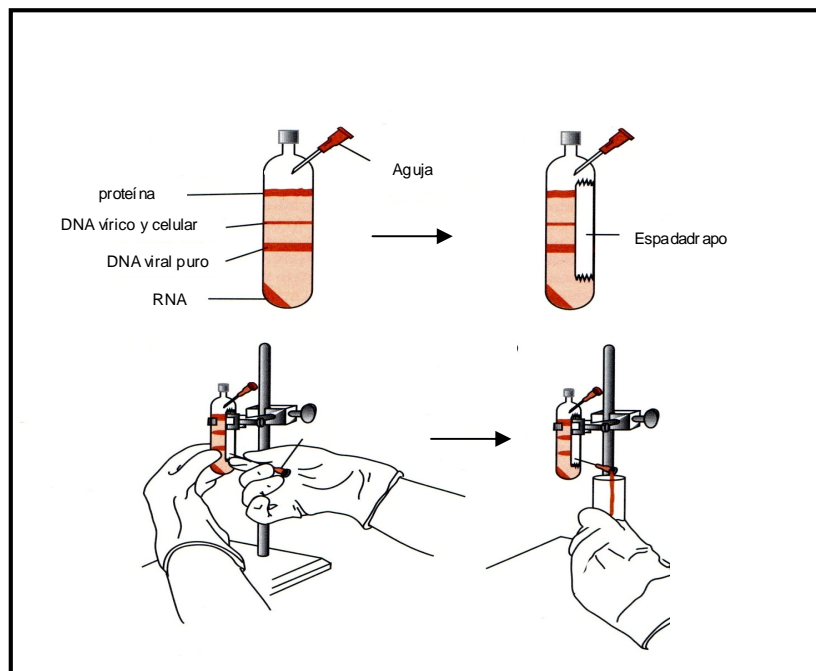


Figura 7. Esquema de la Extracción del DNA vírico total, después de la ultracentrifugación. Adaptado de Sambrook y Rusell, 2001.

3.2.8.2. Aislamiento del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico para efectos de rutina y comprobación de transformantes fue hecha por lisis alcalina tradicional. Para obtener concentraciones de DNA entre 800-1000 ng/µl y de más pureza se usó el plasmid MIDI kit de Quiagen® siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

3.2.8.3. Aislamiento de DNA de BAC (Bacterial Artificial Chromosome)

La extracción del DNA de los BACs, debido a su bajo número de copias, fue realizada por medio del large-construct Kit de Quiagen®, siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y obteniendo DNA a concentraciones aproximadas de 200-500 ng/μl.

3.2.9. ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.2.9.1. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras se analizaron en geles de agarosa (SeaKem®) con Bromuro de Etidio 0,1 μg/ml que fueron visualizados en el transiluminador y registrados fotográficamente (Gelprinter Plus de TDI). La visualización de ácidos nucleicos en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Seaplaque® agarose, Cambrex) se realizó en Spectroline® (Spectronics) y su posterior purificación fue realizada por medio de las columnas Wizard® PCR preps DNA purification system (Promega) o del gene clean® turbo kit (Q-Biogene), siguiendo las recomendaciones de las respectivas casas comerciales.

3.2.9.2. Amplificación del DNA por PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

Método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA que emplea dos iniciadores oligonucleótidos, sintetizados por Roche, que hibridan a hebras opuestas y flanquean la región de interés en el DNA diana. Una serie de ciclos que abarcan la desnaturalización del DNA molde, el anillaje de los cebadores y posterior extensión de los cebadores unidos mediante la DNA polimerasa, da como resultado la acumulación exponencial de un fragmento específico cuyas terminaciones están definidas por los extremos 5' de los iniciadores. Debido a que los productos sintetizados en un ciclo pueden servir como molde para el siguiente, el número de copias de DNA dianas aproximadamente se duplica luego de cada ciclo (Erlich, 1989).

La mezcla de reacción se preparó con:

1,5mM Cl_2Mg (Quiagen®), 10mM dNTP (4) (Applied Biosystems), 1 μ M iniciadores, concentración final 1X de los Buffer Q y 10X (Quiagen®) y 2 unidades HotStar Taq DNA polimerasa (Quiagen®).

Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: ciclos de desnaturalización de la doble cadena de DNA de 1 minuto a 95°C, anillamiento es decir hibridación de los iniciadores al extremo 3' específico de cada una de las hebras: normalmente de un minuto de duración a una temperatura según la secuencia del iniciador, y finalmente elongación, donde se produce la síntesis de la cadena sencilla: de 1 minuto a 72°C. Los iniciadores empleados se detallan en la **Tabla 2**.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador GeneAmp PCR System 2400 de Perkin Elmer.

3.2.9.3. Secuenciación automática

Se realizó empleando el secuenciador automático del parque científico de Madrid (Universidad Autónoma de Madrid). Para proceder a la secuenciación, el producto de PCR fue purificado por filtros Montage™ PCR (Millipore) y el DNA plasmídico fue precipitado con etanol absoluto y finalmente resuspendido en agua a una concentración mínima de 100ng/ μ l. La secuenciación se llevó a cabo utilizando como iniciadores los mismos empleados en la amplificación o los iniciadores universales de los vectores correspondientes. Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en las bases de datos <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

DIANA	NOMBRE	SECUENCIA
Secuencias de empaquetamiento <i>pac2</i>	Pac2A	5' TCG CCA TCC ACA ACC TCC 3'
	Pac2B	5' TTC CAT TGG GGT GAA TGG 3'
Proteína gG de PRV	gG-D	5' AGC TCT GCT ACG GCC ACC 3'
	gG-R	5' TCA GAG TGT CGA TGC GCG 3'
Proteína IE180 de PRV	180-D	5' CGC TTC AAC CAG TTC TGC 3'
	180-R	5' TGA AGG TCT TCT GGG TGC 3'
DNA polimerasa de PRV	DNA POLI-D	5' GTG GAG GTC AAC TGC ACG 3'
	DNA POLI-R	5' GCG ACG GCG TAC ATG TCC 3'
Péptido señal de la gG de PRV	MPGS-D	5' TCC GGA GCG AGT TCG TCC 3'
	MPGS-R	5' CTC CAT GGT TGA GCT GTG G 3'
EGFP	GF-F	5' TGACCCTGAAGTTCA 3'
	GFP- ult	5' TAA ACG GCC ACA AGT TCA GC 3'
	GF-R	5' TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG 3'
Poli A de la gG de PRV	POLIAgG-1	5' TGA CGC GGC CGC GCC CGA CTC C 3'
	POLIAgG-2	5' ACG CGT GTG GTA GAC GTC C 3'
TK DE HSV-1	HTK 6D	5' GCA AGA AGC CAC GGA AGT CC 3'
	HTK 6R	5' ATG AGG GCC ACG AAC GCC AG 3'

Tabla 2. Iniciadores empleados en el estudio.

3.2.9.4. Hibridación DNA-DNA “Southern blot”

Técnica que da información con respecto a la localización, tamaño y cantidad de una determinada secuencia. El DNA genómico fue digerido primero con enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se separaron según su tamaño por electroforesis en un gel estándar, el DNA fue desnaturalizado (NaCl 0,5M, NaOH 1,5 N) *in situ* y transferido a una membrana de nylon (HybondTM –N+ de Amersham), por capilaridad en buffer SSC10X (**Figura 8**). El DNA unido a la membrana se hibridó (Tabarés et al., 1981) con fragmentos de DNA utilizados como sonda marcados con fósforo 32 por MegaprimeTM DNA, Labelling System de Amersham Biosciences. Primero la membrana se prehibridó en una solución que consistía en SSC 6X, formamida 30% y SDS al 0,4% a 68°C, por un tiempo mínimo de una hora, posteriormente se añadió la sonda y se hibridó, con una solución que consistía en SSC 6X, DNA de esperma de salmón a 25 µg/ml, denhart 1X, formamida 30%, SDS 0,4%, sonda específica con de 7 a 9 cps, durante 16 horas a 68°C. Finalmente la membrana se sometió a dos lavados con SSC 1X (NaCl 0,15M, citrato sódico 0,015M)-SDS 0,5% a temperatura ambiente, posteriormente otro lavado con SSC 0,1X-SDS0.1% a 50°C durante 15 minutos, dos lavados más a 65°C con SSC 0,1X-SDS 0,1% cada uno de 15 minutos y por último un lavado con SSC 0,1X 10 minutos a temperatura ambiente. Las bandas complementarias para la sonda se evidenciaron por autorradiografía (MXB FILM de kodakTM).

3.2.10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.2.10.1. Preparación de extractos celulares

Los extractos celulares se obtuvieron a partir de células, células transfectadas o células infectadas con virus. Las células de un falcón se centrifugaron en minifuga (Heraeus®) a 12000 RPM durante dos minutos, el sedimento celular se lavó con sacarosa 0,34M pH 7,5 dos veces, se resuspendió en sacarosa 0,67mM y se lisó con solución de rotura 1X negativa (SDS 2%, tris 50 mM a pH7), por último fueron sonicados en un sonicador con sonda (Sonication Cell Disruptor de Ultrasonics) durante un minuto. Este extracto se conservó a -20°C hasta su uso en la electroforesis de proteínas.

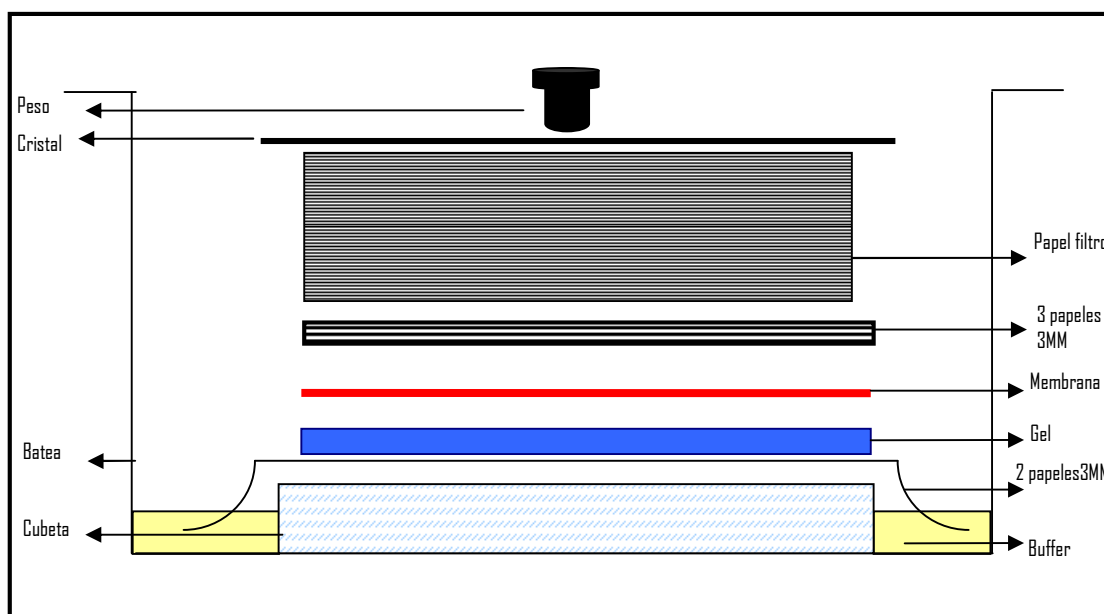


Figura 8. Transferencia de ácidos nucleicos por el método de capilaridad.

3.2.10.2. Electrofóresis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

Las proteínas se analizaron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) a diferentes porcentajes de acrilamida dependiendo del tamaño de la proteína a analizar. Las proteínas se visualizaron por tinción de los geles en una solución de Azul de coomasie al 0,25% en metanol: ácido acético: agua (4:1:5), durante una hora y destinción en una solución de metanol: ácido acético: agua (3,3:1:6,75) durante 16 horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Por último los geles se secaron sobre papel de filtro 3MM (Whatman) durante 1 hora en un secador de geles (DrygelSr., Model SE 1160, Hoefer Scientific).

3.2.11. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *E. coli*

3.2.11.1. Inducción de la expresión de proteínas en *E. coli*

Para la obtención de proteínas recombinantes en *E. coli* se utilizó el método recomendado para el sistema de expresión Xpress Sistem® (Invitrogen). Para ello se transformaron células *E. coli* de la cepa

BL21(DE₃)pLysS con los plásmidos basados en el vector pRSET (Invitrogen) que codificaban para la proteína de interés.

Para inducir la expresión, se crecieron células BL21(DE₃)pLysS transformadas en 250ml de LB, suplementado con Ampicilina 100 µg/ml y Cloramfenicol 20 µg/ml, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O)_{600nm} entre 0,2 – 0,35. En este momento se indujo la expresión de las proteínas con IPTG 1mM incubando a 37°C en agitación durante 5 horas más, tras las cuales las células se recogieron por centrifugación (Sorvall® RC6) durante 15 minutos a 6500 RPM, el sobrenadante se eliminó y el sedimento se congeló a -70°C durante 16 horas. Los cuerpos de inclusión se obtuvieron al lavar el sedimento dos veces con Buffer fosfato (Buffer fosfato sódico 20mM pH 7,8 y NaCl 500mM) y posteriormente sonicarlo 6 veces en sonicador con sonda (Sonication Cell Disruptor de Ultrasonics) durante 1 minuto con intervalos de 30 segundos. Después de lo cual se sometió a dos congelaciones a -70°C y descongelaciones a 37°C consecutivas. Posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm, se recogió el sobrenadante y se lisó con solución de rotura 1X negativa (SDS 2%, tris 50 mM a pH7). Para ver la concentración de estas proteínas se añadió buffer de ruptura (Tris 0,04M, SDS (BioRad) 1,6%, glicerol (Merck) 60%, Azul de Bromofenol (Serva) 0,016%, 2 β-mercaptoetanol (BioRad) 24%), se hirvieron durante tres minutos y se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (apartado 3.2.10.2).

3.2.11.2. Purificación de las proteínas mediante electroelución

La electroelución de las proteínas recombinantes se realizó como se ha descrito (Tabares et al., 1981), a partir de extractos celulares de *E. coli* obtenidos como se describe en el apartado 3.2.11.1. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida que posteriormente se congelaron a -20°C por un mínimo de 24 horas. A continuación se tiñó una tira de cada uno de los laterales del gel con Azul de Coomassie, para poder así determinar la localización de la proteína de interés mediante las fórmula: $X_{cm} = (cm_1 \times cm_2) / cm_3$, donde X_{cm} es la distancia en centímetros desde la parte superior del gel congelado al

centro de la banda a localizar en dicho gel; cm_1 es la distancia en centímetros de la parte superior de la tira del gel teñido al centro de la proteína allí teñida; cm_2 es la longitud en centímetros del gel congelado; y cm_3 es la longitud en centímetros de la tira del gel teñido. Una vez localizada se cortó, en el gel congelado, una franja de 1cm de ancho correspondiente a la movilidad de la proteína. La electroelución se hizo siguiendo las recomendaciones de la comercial del Electro-Eluter (Mod.:422, BioRad), sumergiendo fragmentos de acrilamida en tampón de electroelución (Tris 25mM, glicina 192mM, SDS 0,1%) durante 5 horas a una corriente eléctrica de 8-10mA/tubo de electroelución. Una vez electroeluidas las proteínas, éstas se sometieron nuevamente a electrofóresis en condiciones desnaturalizantes y posterior tinción con Azul de Coomasie para verificar su identidad, concentración y pureza.

3.2.12. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS MONOESPECÍFICOS

El antígeno se preparó inmediatamente antes de la inmunización, utilizando 50 μ g de la proteína purificada según el método descrito anteriormente (apartado 3.2.11.2). El antígeno se empleó en una proporción de 1:1 con adyuvante completo de Freund (Sigma), en la primera inoculación, o con adyuvante incompleto de Freund (Sigma) en las siguientes inoculaciones. Para facilitar su emulsión se hicieron dos sesiones, de 30 segundos con un intervalo de 1 minuto de reposo en hielo, de sonicación en un sonicador con sonda (Sonication Cell Disruptor de Ultrasonics).

Se inmunizaron dos conejos llevando a cabo el siguiente protocolo:

-Día cero: Extracción de suero preimmune (Suero cero) e inoculación del antígeno de forma intradérmica.

-Día 15: Extracción de suero 1 y primera inoculación intramuscular.

-Día 21: Extracción de suero 2 y segunda inoculación intramuscular.

-Día 28: Extracción de suero 3 y tercera inoculación intramuscular.

-Día 43: Extracción de suero 4 y primera inoculación subcutanea.

- Día 58: Extracción de suero 5 y segunda inoculación subcutanea

-Día 73: Sangría total, obtención suero 6

3.2.13. MÉTODOS DE INMUNODETECCIÓN

3.2.13.1. “Western blot”

Usado para la identificación y cuantificación de proteínas específicas dentro de una mezcla de proteínas (Sambrook y Rusell, 2001). Las proteínas se separaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes y se transfirieron a un soporte sólido, membrana de PVDF (Amersham Biosciences), por medio de un equipo de transferencia en semiseco (Trans-blot R-SD®Bio Rad) posteriormente la membrana se bloqueó con solución de bloqueo al 2% (Agente de bloqueo, ECL Advance detection reagentes-Amersham Biosciences) en PBS-TWEEN 20 al 0,05%.

En la inmunodetección (Bakkali et al., 1994), la membrana se expuso a anticuerpos específicos para la proteína diana (Anticuerpo péptidico frente la EGFP, de BD Biosciences Clontech diluido 1:200, anticuerpo monoespecífico frente a la proteína IE180 de PRV diluido 1:400, anticuerpo monoespecífico frente a la proteína gG diluido 1:600, anticuerpo monoclonal frente a la actina, de Labvision, diluido 1:400). Finalmente, después de varios lavados con PBS-TWEEN 20 al 0,05%, el anticuerpo unido fue detectado por medio de un anticuerpo secundario marcado con proteína conjugada con peroxidasa de rábano picante, según el tipo del anticuerpo primario, se reveló con reactivos quimioluminiscentes (ECL™ Western blotting detection reagents, Amersham Biosciences RPN 2106 y RPN 2135), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial y se evidenció por autorradiografía (MXB FILM de kodak™).

3.2.13.2. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Mediante la técnica de ELISA se detectan anticuerpos, específicos en un suero problema, mediante su reacción con el antígeno, inmovilizado sobre una fase sólida, esta unión antígeno-anticuerpo se evidencia por medio de un anticuerpo secundario marcado con una enzima, produciendo una reacción

coloreada al actuar sobre un sustrato específico y cuya intensidad puede ser medida por espectrofotometría (**Figura 9**).

A placas de ELISA (Maxisorp™, Nunc) primero se les fijó el antígeno de interés, aproximadamente 1 µg/pocillo del extracto de células infectadas, mediante incubación toda la noche a 37°C, posteriormente fueron fijadas con formaldehído al 10% (Sigma) durante 15 minutos. Se bloquearon con BSA al 1% (Roche) en PBS toda la noche a 4°C. Los sueros diluidos en solución de bloqueo con Tween 20 al 0,05%, se incubaron por una hora a 37°C, a continuación se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05%, el anticuerpo unido fue detectado por medio de una anti-inmunoglobulina (proteína A) conjugada con peroxidasa de rábano picante, de Sigma, a una dilución de 1:20000 durante una hora a 37°C, tras la cual se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0,05%, se añadió el sustrato cromogénico o-phenyldiamina (OPD) (Sigma), que se dejó reaccionar por 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, dicha reacción se detuvo con ácido sulfúrico 3N. Finalmente las absorbancias fueron leídas en un lector de ELISAS (EIA Reader modelo EL 307 de Bio-Tek Instruments, inc) a 490nm de longitud de onda.

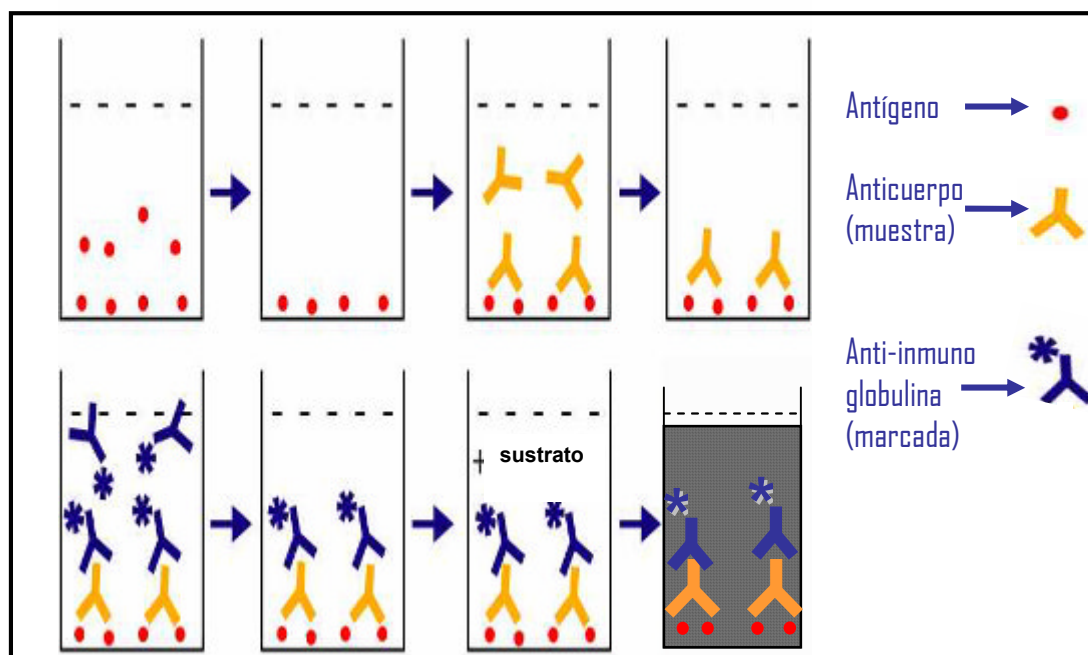


Figura 9. Esquema representativo sobre la realización de un ELISA, adaptado de microvet.arizona.edu/.../ToolBox/elisa.html

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. COMPARACIÓN DEL PROMOTOR gG DE PRV Y DEL PROMOTOR INMEDIATAMENTE TEMPRANO DEL CITOMEGALOVIRUS (IE-CMV)

La glicoproteína gG de PRV es una proteína temprana que se excreta al medio de células infectadas (Thomsen et al., 1987a). Esta glicoproteína se expresa bajo un promotor que ha sido ampliamente utilizado para la expresión de proteínas foráneas usando como vector al PRV (Mettenleiter & Rauh, 1990, Muñoz et al., 2006, Thomsen et al., 1987a). Con el fin de comprobar la expresión proteica producida bajo este promotor se comparó con otro promotor fuerte como es el IE-CMV, utilizando plásmidos, amplicones y la “green fluorescent protein” (EGFP) como proteína marcadora.

4.1.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PLÁSMIDOS

4.1.1.1. Obtención del plásmido pZRHEGFP

El plásmido pZRHEGFP fue obtenido al clonar en el vector pUC18 las regiones de recombinación homóloga izquierda y derecha para recombinar con el virus gIS8, el gen que codifica para la EGFP como proteína marcadora bajo el promotor gG de PRV, su péptido señal y finalmente el poli A de la TK de HSV-1 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) (**Figura 11, A**). La secuencia de recombinación homóloga izquierda consiste en 1181 nt del fragmento *Bam*HI-7, dianas *Kpn*I y *Sma*I, localizadas inmediatamente a la izquierda del dominio α 4TK del virus recombinante gIS8; la secuencia de recombinación homóloga derecha es un fragmento de 638nt que además contiene el poli A de la TK de HSV-1, ubicado justo en el extremo derecho terminal del dominio α 4TK. El fragmento α 4TK corresponde a la quimera constituida por el promotor de la ICP4 y el gen de la TK de HSV-1 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004, Post et al., 1981). El

fragmento *AccI-NotI* del plásmido pEGP-N1, que corresponde a la región codificante de la EGFP, fue insertado en fase después de los primeros 21 aminoácidos de la gG, es decir después del péptido señal (Rea et al., 1985). El promotor gG está incluido en los 517nt por delante del codón de iniciación de la gG. Este plásmido fue caracterizado en estudios previos de nuestro laboratorio y se utilizó para la obtención del amplicón pOGFP (apartado 4.2.2.1) y del virus recombinante D3 (apartado 4.2.2.1.1). Con cualquiera de las construcciones que tienen la EGFP después del péptido señal se observa disminución de la intensidad de la fluorescencia, comparado con la fluorescencia expresada por el amplicón pORIPAC-GF (**Figura 10**).

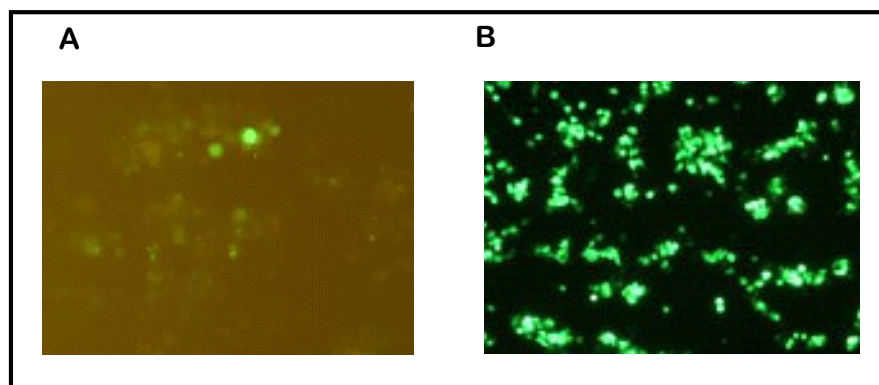


Figura 10. Comparación de intensidad de la fluorescencia entre los amplicones pOGFP y pORIPAC-GF. Células 293T transfectadas + 5µg de DNA de pBecker2 (foto A); 5 µg de pORIPAC-GF + 5µg de DNA de pBecker2 (Foto B).

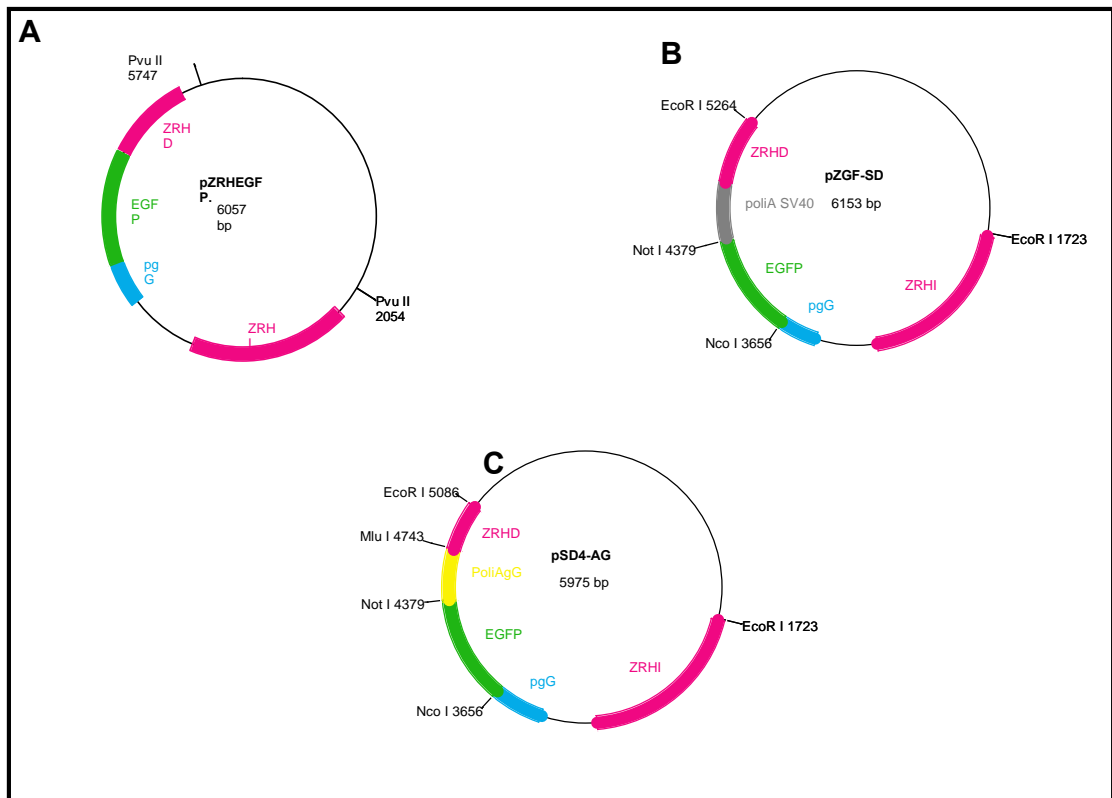


Figura 11. Mapas de restricción. Plásmidos A. pZRHEGF; B. pZGF-SD; C. pSD4-AG

4.1.1.2. Obtención y caracterización de los plásmidos pZGF-SD Y pZGF-SD4

4.1.1.2.1 Cambio del poli A de la TK de HSV-1 por el poli A de SV40

Los plásmidos pZGF-SD y pZGF-SD4 se obtuvieron para superar el problema de la baja intensidad de la fluorescencia que se produce con el plásmido y el amplicón provenientes del pZRHEGF.

Para obtener los plásmidos pZGF-SD y pZGF-SD4 fue necesario obtener primero el plásmido pZHU-GF-E, el cual tiene el poli A de SV40. El plásmido pZHU-GF-E se construyó a partir del plásmido pZRHEGF, al cambiar el poli A de la TK de HSV-1 por el poli A de SV40 e introduciendo una diana *EcoRI* (obtenida a partir de 229nt del plásmido pBR322 donde está incluida la diana *EcoRI*) para así facilitar los clonajes de los “cassettes” de recombinación y expresión entre los plásmidos y amplicones. En conclusión

el plásmido pZHU-GF-E contiene: la zona de recombinación homóloga izquierda (la misma que el plásmido pZRHEGFP, 1181 nt del fragmento *BamHI*-7, dianas *KpnI* y *SmaI*, localizadas inmediatamente a la izquierda del dominio α 4TK del virus recombinante gIS8) zona de recombinación derecha (410nt del fragmento *BamHI* 7, localizados inmediatamente a la derecha del dominio α 4TK en el gIS8), el gen que codifica para la EGFP como proteína marcadora bajo el promotor gG de PRV y su péptido señal, además del poli A de SV40. Al cotransfectar células 293T con el pZHU-GF-E y usando como virus cooperador el pBecker2 (**Figura 12, foto1**) se observa que la intensidad de la fluorescencia sigue siendo menor, en comparación con la intensidad de fluorescencia observada al cotransfectar células 293T con el amplicón pORIPAC-GF junto con el pBecker2 (**Figura 12, foto 2**) lo que significa que el poli A no está relacionado con disminución de la intensidad de la fluorescencia.

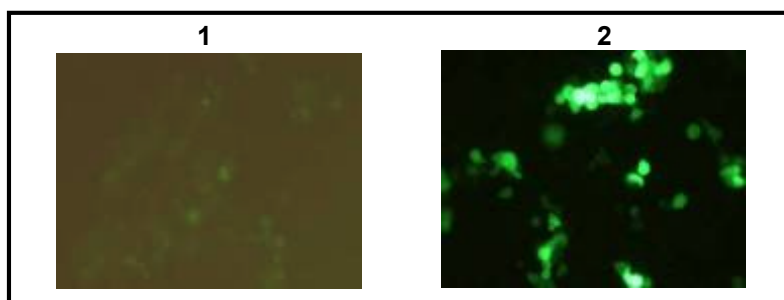


Figura 12. Comparación de la intensidad de fluorescencia. Células 293T cotransfectadas con 5 μ g de DNA del pBecker2 más: 5 μ g de DNA del pZHU-GF-E (foto 1); 5 μ g de DNA del pORIPAC-GF (foto 2).

4.1.1.2.2. Eliminación de la secuencia del péptido señal en el plásmido pZHU-GF-E

Continuando con la intención de aumentar la intensidad de la fluorescencia se eliminó el péptido señal de la gG en el plásmido pZHU-GF-E mediante PCR, la estrategia se esquematiza en la **Figura 13**. Para ello se diseñaron los iniciadores MPGS-D Y MPGS-R (este último modificado en su extremo 5' para originar de este modo la diana *NcoI*) por medio de los cuales se amplificó la región, de 247 nucleótidos (nt), que no incluye la región de

94nt, que va desde codón de iniciación de la gG hasta el codón de iniciación de la EGFP, la cual contiene el péptido señal.

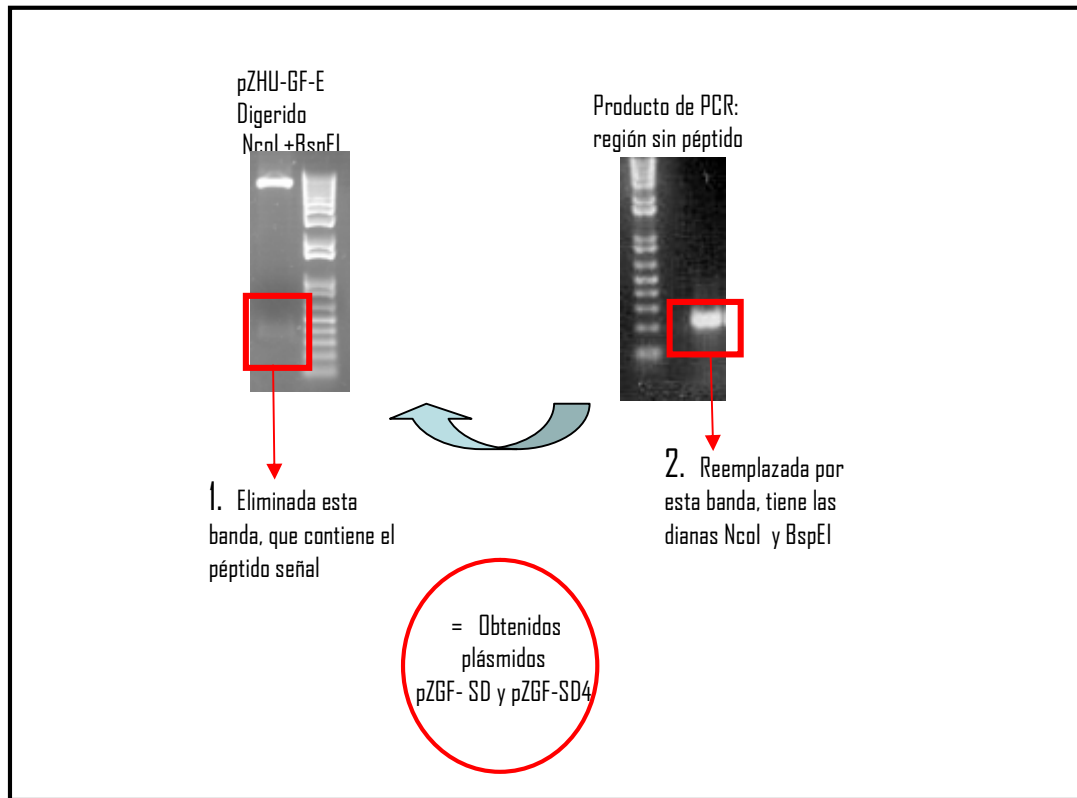


Figura 13. Estrategia de eliminación del péptido señal en el plásmido pZHU-GF-E.

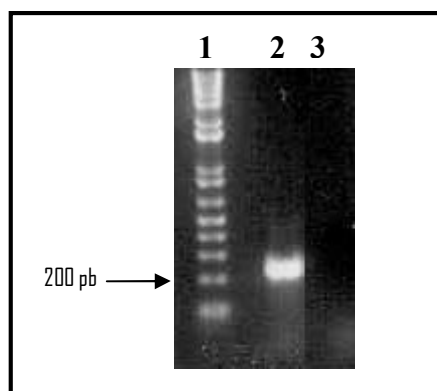


Figura 14. Amplificación de la secuencia sin péptido señal. Usando los iniciadores MPGS-D y MPGS-R. Marcador de tamaño (carril 1); DNA amplificado del pZHU-GF-E (carril 2); Control negativo (carril 3).

El producto de PRC, de 247 pares de bases (pb), (**Figura 14**) fue purificado y clonado en el vector pGEM-T, los clones obtenidos se caracterizaron por digestión con la enzima *NcoI* que de acuerdo con la construcción esperada debía linearizar en 3247pb y por digestión con *NcoI*+*PstI* que según la construcción esperada debían liberar el inserto (247nt) (**Figura 15**).

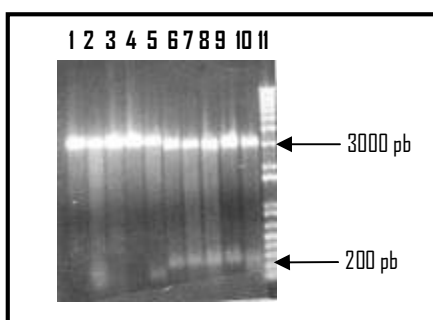


Figura 15. Caracterización del plásmido pCG. Colonias 1, 4, 6, 9 y 10 respectivamente digeridas con *NcoI* (carriles 1 al 5); colonias 1, 4, 6, 9 y 10 respectivamente digeridas con *NcoI* y *pSTI* (carriles 6 al 10); marcador de tamaños (carril 11).

Se seleccionaron las colonias 1 y 4 (denominadas pCG1 y pCG4 respectivamente), se secuenciaron, lo que evidenció que el plásmido pCG1 tenía una mutación, ocasionada por el proceso de PCR, consistente en la sustitución de 10 nucleótidos entre los nucleótidos 2 al 21 desde el ATG (**Figura 16**). Sin embargo se confirmó por secuenciación que el plásmido pCG4 estaba correcto.

pZHU-GF-E

Cebador MPGS-D

TCCGGAgcga gttcgtcc

TCCGGAgcga gttcgtccgg tacgccggga cccaccggca gccgtacacg cagtacgcgc
gcgtggctcg cctcgggctg cccgagacgg gggctttcct gatttacaag atgttgacgt
ttgatcccg cgcgcgcct tccgtgatg agatactcaa ctttggatg tggaccgtat
aaaacgggccc ggctccgagc ggtaggacac acacaccttt gcgcattctc acagctcaac

G (NIA3)

C

C ATG G

a atg aag tgg gca acg cgg atc etc gcc etc ggg etc etc gtg gtc cgc acc
gtc gtg gcg *(peptidase)
(fusion peptide)
gcg* acg gta cgg gcc cgg gat cca cgg gtc gcc acc ATG GTG AGC AAG GGC GAG CTG

Cebador MPGS-R

ccacagctcaa CCATGGag

pZGF-SD

acacacctttAATCCCGCGGcc ATG GTG AGC

pZGF-SD4

acacaccttt gcgcattctc acagctcaacc ATG GTG AGC

Figura 16. Secuencia del plásmido pZHU-GF-E. Se observan las secuencias de los iniciadores, la ubicación del péptido señal y la secuencia de los plásmidos obtenidos sin péptido señal (pZGF-SD y pZGF-SD4).

A continuación se eliminó el péptido señal del plásmido pZHU-GF-E, digiriéndolo con las enzimas *BspEI* y *NcoI*, produciendo dos fragmentos uno de 5904nt y otro de 341nt (en donde se encuentra la secuencia promotor gG-péptido señal). El fragmento de 5904nt fue ligado, respectivamente, con el fragmento de 247nt obtenido a partir de digerir los plásmidos pCG1 y pCG4 con las enzimas *BspEI-NcoI*, de este modo se obtuvieron los plásmidos pZGF SD y pZGF SD4 (**Figura 11, panel B**), que fueron caracterizados por secuenciación (**Figura 16**) y endonucleasas de restricción (**Figura 17**).

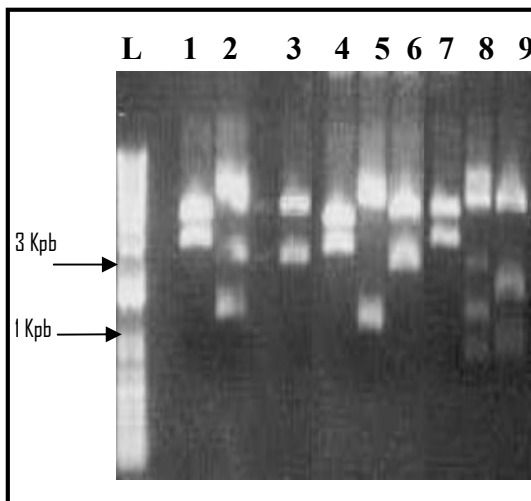


Figura 17. Caracterización de los plásmidos pZGF- SD y SD4 por endonucleasas de restricción. marcador de tamaños (L); pZGFSD4 + *EcoRI* fragmentos de 3,6 y 2,6Kpb (carril 1); pZGFSD4 + *KpnI*, fragmentos de 5 y 1,2kbp (carril 2); pZGFSD4 + *SmaI* fragmentos de 4 y 2,3Kpb (carril 3); pZGFSD + *EcoRI*, fragmentos de 3,6 y 2,6Kpb (carril 4); pZGFSD + *KpnI*, fragmentos de 5 y 1,2kbp (carril 5); pZGFSD + *SmaI*, fragmentos de 4 y 2,3Kpb (carril 6); pZHU-GF-E + *EcoRI*, fragmentos de 3,6 y 2,6Kpb (carril 7); pZHU-GF-E + *KpnI* 4,3; 1,2 y 0,8Kpb (carril 8); pZHU-GF-E + *SmaI* 4; 1,5 y 0,8Kpb (carril 9).

Los plásmidos pZGF-SD y pZGF-SD4 contienen el “cassette” conformado por la EGFP, como proteína marcadora, bajo el promotor gG de PRV y el poli A de SV40, éste flanqueado por las zonas de recombinación homóloga del virus recombinante gIS8, todo esto clonado en el pUC18. Estos plásmidos serán utilizados para construir los amplicones pOGF-SD y pOGF-SD4 (apartado 4.1.2.2) y los virus recombinantes Z y S (apartados 4.2.2.1.2 y 4.2.2.1.3, respectivamente).

4.1.1.3. Obtención y caracterización del plásmido pSD4-AG

Con el fin de cambiar el poli A de SV40 por el propio poli A de la gG para su utilización en la obtención de virus recombinantes, que lleven únicamente secuencias específicas de PRV, a excepción de las proteínas de interés, se obtuvo el plásmido pSD4-AG. La única diferencia entre los plásmidos pZGF-SD4 y pSD4-AG es que el plásmido pSD4-AG tiene el poli A de la gG de PRV y no el poli A del SV40 que es el que tiene el plásmido pZGF-SD4. El poli A de la gG está incluido en un fragmento de 357nt localizado justo después del codón de terminación TGA de la gG, del nucleótido 120.892 al 121.249, en el genoma viral, (Klupp et al., 2004).

Para la construcción del plásmido, la estrategia a seguir fue primero la amplificación por PCR del poli A de la gG y paralelamente la eliminación del poli A de SV40 del plásmido pZGF-SD4, para finalmente cambiar el poli A de SV40 por el poli A de la gG previamente amplificado por PCR.

Para ello gen del poli A de la gG fue amplificado por PCR (fragmento de 357nt, flanqueado por las enzimas de restricción *NotI* y *MluI*) mediante los iniciadores poliAgG1 y poliAgG2 (**Figura 18**), a partir del plásmido pRSTG-10 (plásmido que contiene toda la zona codificante y el poli A de la gG de PRV clonados en el plásmido pRSETB).

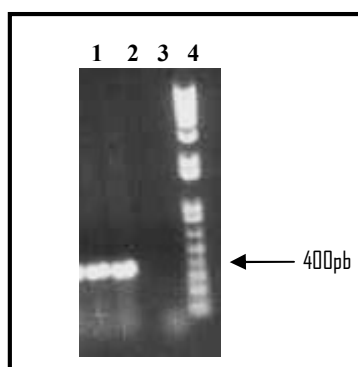


Figura 18. Amplificación del gen poli A de la gG de PRV. Usando los iniciadores poliAgG1/poliAgG2. DNA amplificado: pRSTG10 (carriles 1 y 2); control negativo (carril 3); marcador de tamaños (carril 4)

El producto de PCR fue clonado en el vector pGEMT- easy y los clones obtenidos fueron caracterizados por digestión con la enzima de restricción

EcoRI, que de acuerdo con la construcción esperada debía originar dos fragmentos, uno de 3000pb correspondiente al vector y otro de 365pb correspondiente al inserto (**Figura 19**). Se seleccionó la colonia 6, que además fue caracterizada por secuenciación, obteniendo así el plásmido pGpoliAgG.

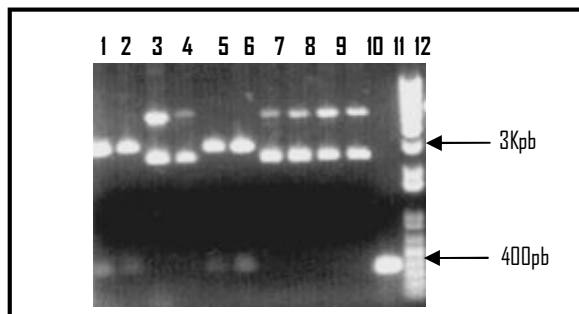


Figura 19. Caracterización colonias pGpoliAgG. Colonias obtenidas del clonaje entre el pGEMT-easy y el producto de PCR poliAgG digeridas con *EcoRI* (carriles 1 al 10); Producto de PCR poliAgG-control + (carril 11); marcador de tamaño (carril 12).

El cambio del poli A de SV40 por el poli A de la gG se hizo sobre el plásmido pZGF-SD4, el cuál fue digerido con las enzimas de restricción *MluI* y *NotI* obteniendo dos fragmentos, uno de 542pb (donde está incluido el del poli A de SV40), y otro de 5611pb. A su vez el plásmido pGpoliAgG también fue digerido con las mismas enzimas obteniendo dos fragmentos uno de 3000nt, correspondiente al vector, y otro de 357nt, correspondiente al poli A de la gG. Las bandas de 5611pb (proveniente del pZGF-SD4) y la de 357nt (proveniente del pGpoliAgG), se ligaron y se caracterizaron por digestión con las enzimas de restricción *MluI* Y *NotI*, que de acuerdo con la construcción esperada debía originar dos fragmentos de 5,6 Kpb y de 357pb cada uno (**Figura 20**), se seleccionó la colonia 8 y se denominó pSD4-AG (**Figura 11, panel C**).

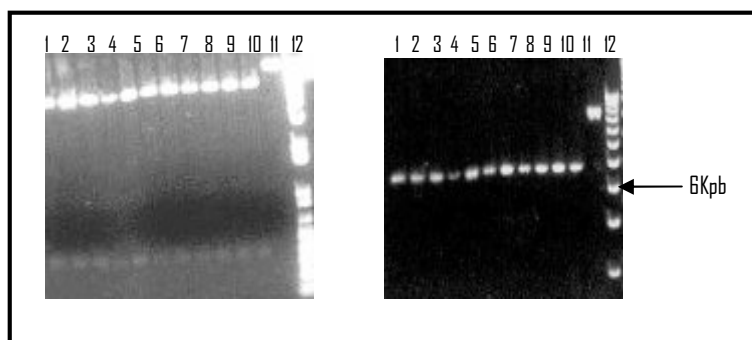


Figura 20. Caracterización colonias pSD4-AG. Colonias obtenidas del clonaje entre el pZGF-SD4 y el pGpoliAgG, digeridas con *MluI* y *NotI* (carriles 1 al 11); pZGF-SD4 digerido con *MluI* y *NotI* (carril 11); marcador de tamaño (carril 12).

A su vez este plásmido daría origen al amplicón pOSD4-AG y al virus recombinante R10 (apartados 4.1.2.3 y 4.2.2.1.5, respectivamente).

4.1.1.4. Obtención y caracterización del plásmido p180FG

El plásmido p180FG se construyó con el objetivo expresar la EGFP bajo el control del promotor IE180, y así poder emplearlo como un control inmediatamente temprano en ensayos de comparación de la expresión de la EGFP.

La estrategia seguida fue la de sustituir el promotor gG de PRV en el plásmido pSD4-AG por el promotor IE180, para ello fue necesario construir primero un plásmido intermedio, denominado pPr180, el cual contiene del nucleótido 138.741 al 136.941 del genoma de (Klupp et al., 2004), en los cuales está incluido el promotor IE180 (Yamada & Shimizu, 1994), clonados en el vector pUC18. Una vez caracterizado este plásmido por secuenciación se procedió a la obtención finalmente del p180FG, para ello se digirió el plásmido pSD4-AG con las enzimas de restricción *XhoI* relleno-*NcoI*, originando dos fragmentos de 5435nt y 540nt (donde está incluido el promotor gG) cada uno; y el plásmido pPr180 se digirió con las enzimas *HinDIII* relleno-*NcoI* originando dos fragmentos de 3.4kpb y 1.6kpb (donde está incluido el promotor IE180 de PRV), se ligó el fragmento de 5435nt (procedente del pSD4-AG) junto con el 1.6kpb para así obtener el plásmido p180FG, que se caracterizó por secuenciación y enzimas de restricción (**Figura 21**).

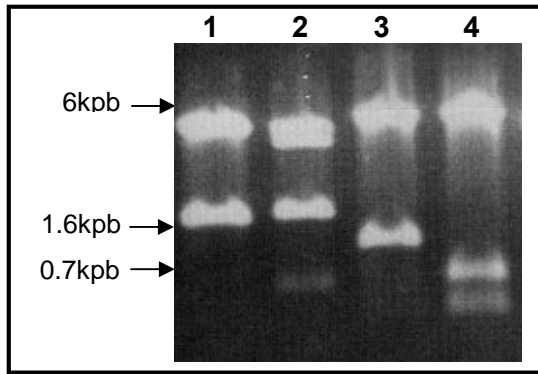


Figura 21. Caracterización del plásmido p180FG. Digerido con *Bam*HI originando fragmentos de: 1.8 y 5,2kpb (carril 1); *Bsr*GI originando fragmentos de 0.6, 2 y 4,2kpb: (carril 2); *Not*I originando fragmentos de: 1.2 y 5,8kpb (carril 3); *Nco*I originando fragmentos de: 0.5, 0.7 y 5.8kpb (carril 4).

4.1.2. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AMPLICONES

Los amplicones de herpes simplex son vectores usados en terapia génica y consisten en un plásmido bacteriano que tiene el transgen de interés, el origen de replicación y las secuencias de empaquetamiento del virus, además necesita viriones defectivos para conseguir empaquetarse. Amplicones de PRV han sido utilizados en esta parte del estudio como herramientas de expresión de la proteína marcadora.

Todos los amplicones se construyeron a partir del DNA plasmídico obtenido de digerir el plásmido correspondiente con *Eco*RI, generalmente, y posteriormente utilizado para clonarlo en la diana *Eco*RI del amplicón pORIPAC (Prieto et al., 2002) (**Figura 22**) para detectar la expresión de la proteína marcadora antes de proseguir con la generación de virus recombinantes utilizando el mismo “cassette” (**Figura 33**).

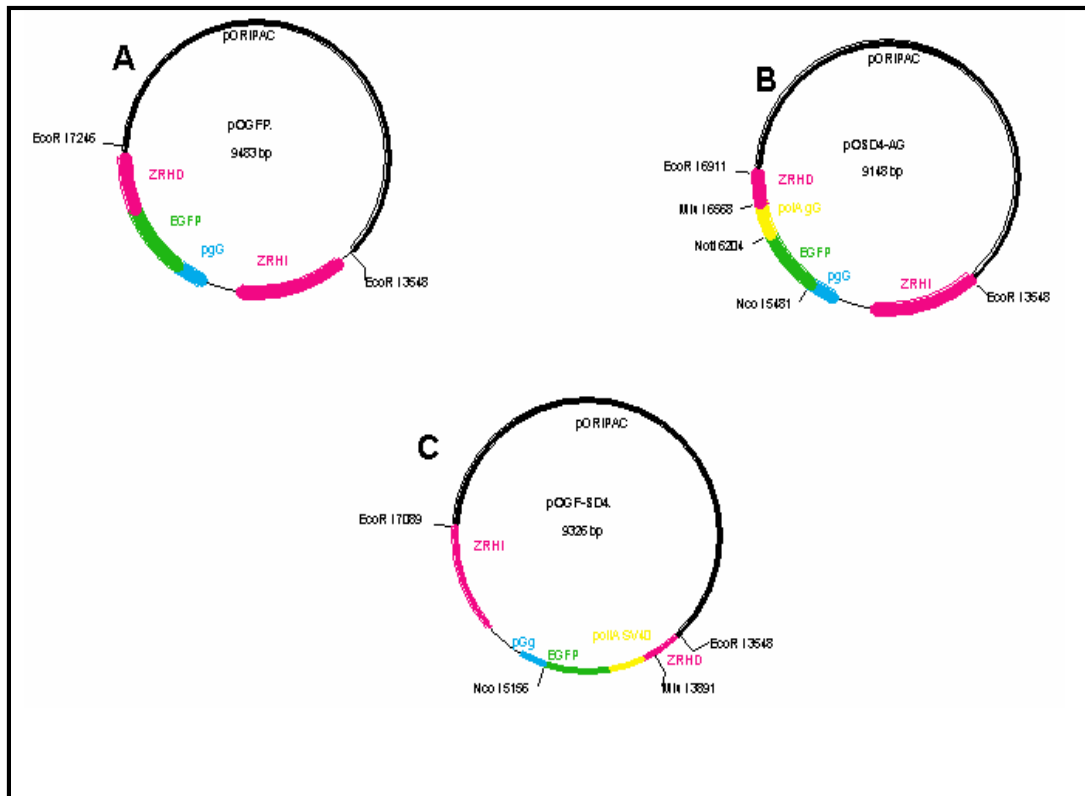


Figura 22. Mapas de restricción de los amplicones. A. pOGFP; B. pOGF-SD4; C. pOSD4-AG

4.1.2.1. Obtención del amplicón pOGFP

Este amplicón se obtuvo a partir del plásmido pZRHEGFP (apartado 4.1.1.1), para ello el amplicón pORIPAC se linearizó con la enzima *EcoRI* y posteriormente se rellenó; paralelamente el plásmido pZRHEGFP fue digerido con *pvuII*, enzima que libera el “cassette” de 3152nt que corresponde a las zonas de recombinación homóloga- promotor gG- péptido señal-EGFP- poli A de la TK de HSV-1 (Muñoz et al., 2006).

4.1.2.2. Obtención y caracterización de los amplicones pOGF-SD Y pOGF-SD4

Los plásmidos pZGF-SD y pZGF-SD4 (apartado 4.1.1.2) fueron digeridos con *EcoRI*, originando dos fragmentos de 2612 y 3541pb cada uno, se aisló el fragmento de 3541nt que contiene las zonas de recombinación- promotor gG- EGFP-poli A de SV40, de cada plásmido y se ligaron,

separadamente, con el pORIPAC linearizado con *EcoRI* (5785pb). Se obtuvieron colonias que se caracterizaron por enzimas de restricción para así seleccionar a los clones correspondientes a los amplicones pOGF-SD Y pOGF-SD4, respectivamente y se caracterizaron por endonucleasas de restricción (**Figura 23**).

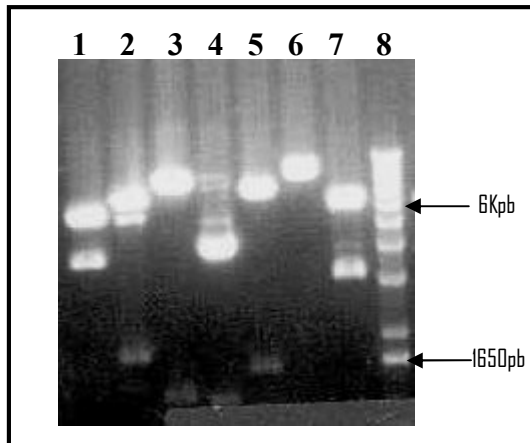


Figura 23. Caracterización del amplicón pOGF-SD. pOGF-SD + *EcoRI*, fragmentos de 3,5 y 5,7kpb (carril 1); pOGF-SD + *BamHI*, fragmentos de 6514, 2013, 799pb (carril 2); pOGF-SD + *NotI*, fragmentos de 8073, 1253pb (carril 3); pOGF-SD + *KpnI*, fragmentos de: 4277, 3860, 1189pb (carril 4); pOGF-SD + *SalI*, fragmentos de 7368, 1546, 412pb (carril 5); pOGF-SD + *NcoI*, Lineariza: 9326pb (carril 6); pOGF-SD + *pSTI*, fragmentos de 6145, 3181pb (carril 7); marcador de tamaños (carril 8).

4.1.2.3. Obtención y caracterización del amplicón pOSD4-AG

El plásmido pSD4-AG (apartado 4.1.1.3) digerido con *EcoRI* produce dos fragmentos de 3355 y 2612pb cada uno. El fragmento de 3355pb (contiene las zonas de recombinación homóloga- el promotor gG- EGFP- poli A de la gG) se ligó con el pORIPAC previamente linearizado con *EcoRI* (5785nt). Se aisló el DNA de 10 colonias, por lisis alcalina, que se caracterizaron por endonucleasas de restricción, obteniendo así el amplicón pOSD4-AG (**Figura 24**).

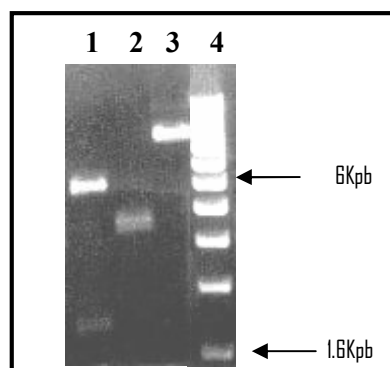


Figura 24. Caracterización del amplicón pOSD4-AG por enzimas de restricción. Gel de agarosa al 0,75%: pOSD4-AG + *pVUII*, fragmentos de 6204, 2364, 580pb (carril 1); pOSD4-AG + *Stul* y *Scal*, 4902 y 4246pb (carril 2); pOSD4-AG + *NcoI* lineariza, 9148pb (carril 3); marcador de tamaño (carril 4).

4.1.3. Expresión celular de la EGFP.

4.1.3.1. Análisis de la expresión en células 293T.

La expresión de la EGFP, bajo control de los promotores gG y IE-CMV, fue estudiada en células humanas (293T) mediante transfección con amplicones. La transfección de las células 293T se realizó mediante fosfato cálcico, obteniéndose una eficacia del 80 al 90%. Esta eficacia fue determinada mediante fluorescencia usando el plásmido pEGFP-N1 como control de transfección. Como agentes cooperadores en estas transfecciones se emplearon el BAC pBecker2 (Smith & Enquist, 1999) y el virus recombinante gIS8 (Férrandez et al., 1999).

En la transfección de células 293T con el plásmido pZRHEGFP o con el amplicón pOGFP no se detecta expresión de la EGFP mediante fluorescencia (**Figura 25, fotos 1 y 3**) ni por “Western blot” (WB) (**Figura 26, panel A, carril A**). La presencia de DNA en las células transfectadas fue confirmada por PCR (**Figura 26, panel B, carril D**). El amplicón pOGFP produce expresión de EGFP cuando se cotransfecta con el BAC pBecker2, que ocasiona la producción de virus. Esta expresión fue detectada por fluorescencia (**Figura 25, foto 5**) y WB (**Figura 26, panel A, carriles B y F**). La expresión de la EGFP bajo el control del promotor gG en el pOGFP y por el promotor IE-CMV en el pORIPAC-GF detectadas por WB fueron similares cuando se cuantifican densitométricamente (**Figura 26, carriles B, F, D, H, G**). Sin embargo en la detección por fluorescencia de la expresión de la EGFP fue menor la producida por el pOGFP (**Figura 25, foto 5**), que por el pORIPAC-GF (**Figura 25, foto 4**). Esto fue debido a la zona de fusión del péptido señal del plásmido con la zona codificante de la EGFP, pues con su eliminación se recupera la intensidad de la fluorescencia (ver apartado 4.2.4.1).

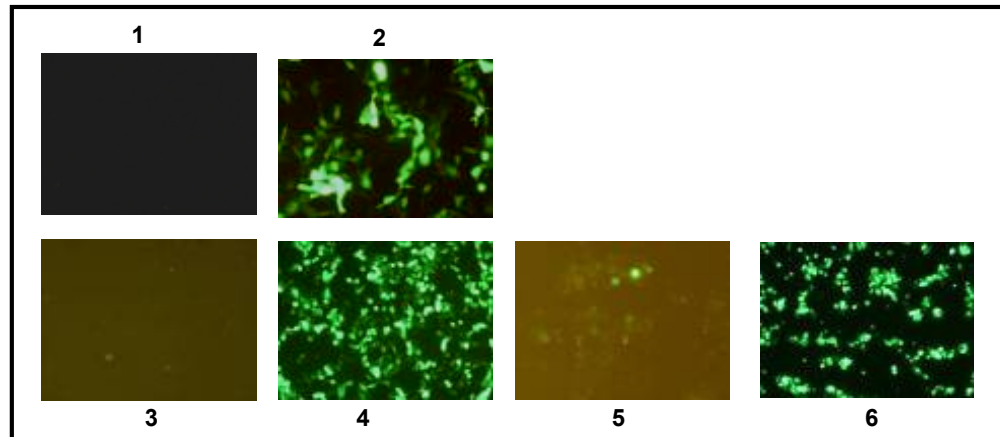


Figura 25. Expresión de la EGFP en células transfectadas: Células 293T transfectadas con 10 μ g de DNA de: 1. pZRHEGFP; 2. pEGFP-N1; 3. pOGFP; 4. pORIPAC-GF; 5. células 293T transfectadas con 5 μ g de DNA de pOGFP + pBecker2; 6. pORIPAC-GF + pBecker2.

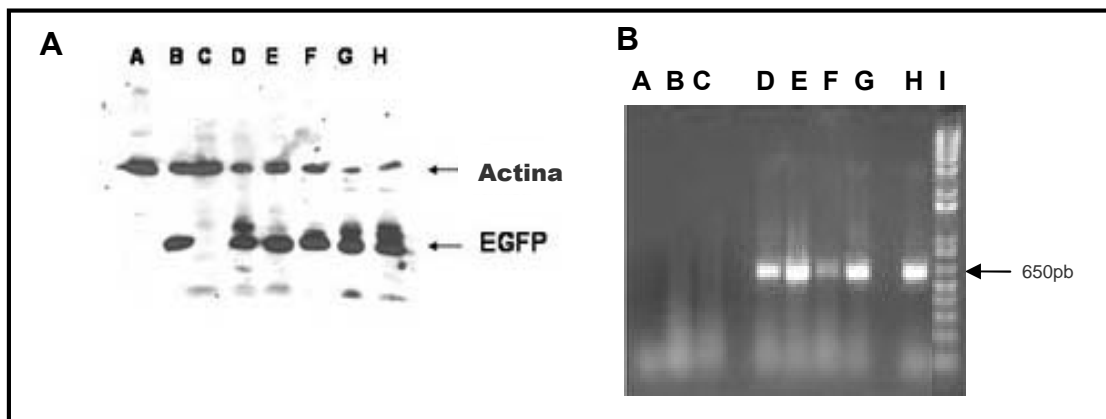


Figura 26. Inmunodetección de la EGFP y actina en células transfectadas. Panel A. Extractos de células 293T transfectadas con: 10 μ g de DNA del pOGFP (carril A); 5 μ g de DNA del pOGFP + 5 μ g de DNA del pBecker2 (carriles B y F); 10 μ g de DNA del pBecker2 (carril C); 5 μ g de DNA del pORIPAC-GF + 5 μ g de DNA del pBecker2 (carriles D y H); 10 μ g de DNA del pEGFP-N1 (carril E); 10 μ g de DNA del pORIPAC-GF (carril G). **Panel B. Detección del gen EGFP a partir de los DNAs de las células 293T transfectadas,** usando los iniciadores GF-F/GF-R con: pBecker2 (carril C); pOGFP (carril D); pOGFP + pBecker2 (carril E); pORIPAC-GF + pBecker2 (carril G); controles negativos (carriles A y O); DNA de salmón (carril B); control positivo: pEGFPN-1 equivalente a 125.000 copias (carril H); marcador de tamaños (carril I).

4.1.3.2 Análisis comparativo de la expresión de la EGFP, bajo los dos promotores, en células 293T y Vero

Para las transfecciones de las células 293T se utilizó el método de la precipitación por fosfato cálcico; las células Vero fueron transfectadas por el método de FuGENE 6 Reaction (Roche Applied Science). La expresión de la EGFP fue valorada tanto por fluorescencia (**Figura 27**) como por “Western blot” (**Figura 28**).

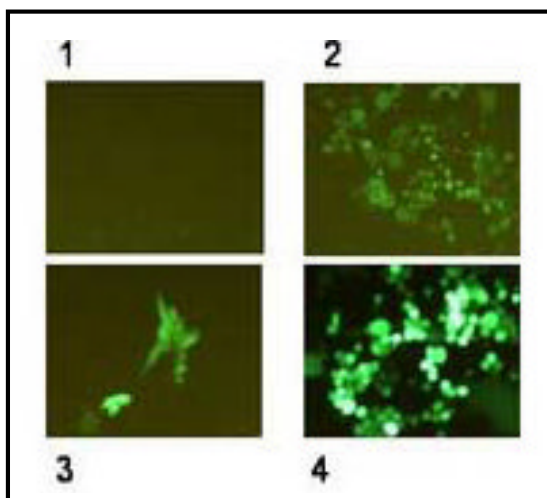


Figura 27. Expresión celular de la EGFP en células Vero: transfectadas con 1 μ g de DNA de: pOGFP (foto 1); pOGFP + DNA viral del gIS8 (foto 2); pORIPAC-GF (foto 3); pORIPAC-GF + DNA viral del gIS8 (foto 4). La expresión de la EGFP fue observada 120 horas pos-transfección por microscopia de fluorescencia.

Para las transfecciones en células Vero se utilizó como virus cooperador el gIS8. Mediante “Western blot”, no se detectó expresión de la EGFP cuando éstas fueron transfectadas con el amplicón pORIPAC-GF, (**Figura 28, carril J**), esto es debido a que la eficiencia de transfección por el método de FuGENE fue menor del 5% (**Figura 27, foto 3**). Sin embargo cuando las células Vero son cotransfectadas con el DNA del virus cooperador gIS8 junto con el amplicón pORIPAC-GF, si se detecta expresión de la EGFP (**Figura 28, Carril I**) debido a que el amplicón se multiplica en presencia del virus cooperador gIS8. Los niveles de expresión de la EGFP tanto con el amplicon pORIPAC-GF como con el amplicon pOGFP, en presencia del virus cooperador gIS8, fueron similares (estimados por análisis de densitometría usando 1D IMAGE TDI™ software), mostrando una relación densitométrica próxima a la unidad (1,025). La detección de la EGFP fue posible por la multiplicación del amplicón pOGFP en presencia del gIS8, sin embargo cuando el plásmido pZRHEGFP (plásmido que contiene el mismo cassette del amplicón pOGFP, pero se diferencian en que el primero no tiene origen de replicación ni secuencias de empaquetamiento) es transfectado con el virus cooperador no hay expresión comprobando que el plásmido no puede replicarse (**Figura 28, carril L**).

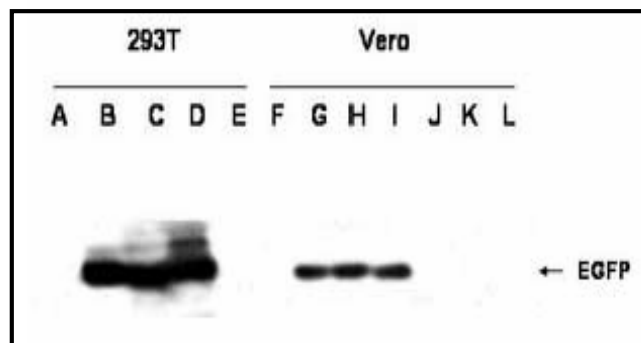


Figura 28. Comparación de la expresión de la EGFP en células 293T y Vero por inmunodetección: Extractos de células 293T previamente transfectadas con: 10 μ g de DNA del pOGFP (carril A); 5 μ g de DNA del pOGFP + 5 μ g de DNA pBecker2 (carril B); 10 μ g de DNA del pORIPAC-GF (carril C); 5 μ g de DNA del pORIPAC-GF + 5 μ g de DNA del pBecker2 (carril D); 10 μ g de DNA del pBecker2 (carril E). Comparados con extractos de células Vero previamente transfectadas con: 1 μ g de DNA del pOGFP (carril F); 1 μ g de DNA del pOGFP + 1 μ g de DNA viral del gIS8 (carriles G y H); 1 μ g de DNA del pORIPAC-GF + 1 μ g de DNA viral del gIS8 (carril I); 1 μ g de DNA del pORIPAC-GF (carril J); 1 μ g de DNA del pZRHEGFP + 1 μ g de DNA viral del gIS8 (carriles K y L).

4.1.4. INFLUENCIA DE LA ZONA DE FUSIÓN DEL PEPTIDO SEÑAL DE LA gG SOBRE LA INTENSIDAD FLUORESCENTE DE LA PROTEÍNA EGFP

La presencia del péptido señal en las construcciones fue determinante para los niveles de intensidad de la EGFP celular ya que la intensidad de la fluorescencia observada en las construcciones que tienen la EGFP fusionada justo después del péptido señal de la gG, es mucho menor que la intensidad de la fluorescencia observada en las construcciones que no tienen el péptido señal. Esto se confirmó al transfectar células con DNA plasmídico junto con un agente cooperador, tanto células 293T (por el método de fosfato cálcico) como Vero (por el método de lipofectamina (Invitrogen)), con el amplicón pOGF-SD4 cuya única diferencia con el amplicón pOGFP es la delección de la secuencia del péptido señal, el amplicón pOGFP muestra una intensidad de la fluorescencia mucho menor (**Figura 29, fotos A1 y B1**) en comparación con el control pORIPAC-GF (**Figura 29, fotos A3 y B3**), sin embargo con el amplicón pOGF-SD4 se evidenció la recuperación de la intensidad de la fluorescencia (**Figura 29, fotos A2 y B2**) a niveles comparables de las observadas en el pORIPAC-GF.

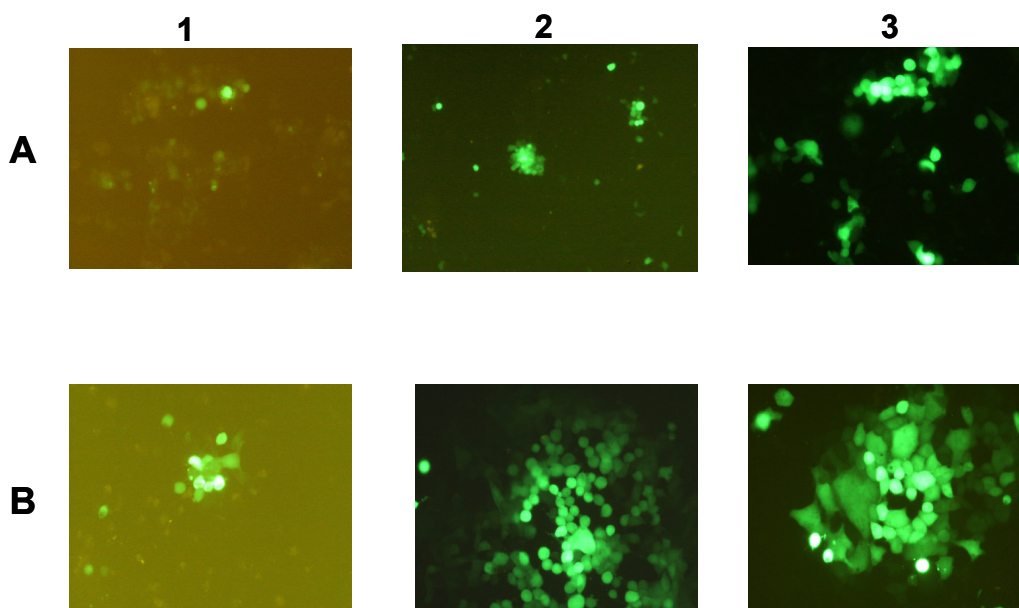


Figura 29. Expresión celular de la EGFP en células transfectadas con amplicones. Panel A. Células 293T transfectadas con 5µg de DNA de: pOGFP + pBecker 2 (foto A1); pOGF-SD4 + pBecker 2 (foto A2); pORIPAC-GF + pBecker 2 (foto A3) Visualizadas por microscopio de fluorescencia 72h pos-transfección. **Panel B. Células Vero transfectadas con 2µg de DNA de:** pOGFP + gIS8 (foto B1); pOGF-SD4 + gIS8 (foto B2); pORIPAC-GF + gIS8 (foto B3). Visualizadas por microscopio de fluorescencia 48h pos-transfección.

4.2. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL PROMOTOR gG de PRV

4.2.1. CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL PROMOTOR gG DE PRV COMO GEN INMEDIATAMENTE TEMPRANO (IE) POR MEDIO DE AMPLICONES Y PLÁSMIDOS

Al transfectar células Vero, por el método de lipofectamina (Invitrogen), tan solo con los amplicones descritos en el apartado 4.1.2 (**Figura 30**), se observó la presencia de algunas células fluorescentes, es decir que había algo de expresión de la proteína fluorescente, que la EGFP bajo el promotor gG de PRV se estaba expresando como sí fuese una proteína inmediatamente temprana (**Figura 30, fotos 2, 3 y 4**), mostrando el mismo

comportamiento que cuando las células Vero son transfectadas con el amplicón pORIPAC-GF, donde la EGFP está bajo el control del promotor IE-CMV (**Figura 30, foto 5**). Sin embargo cuando las células Vero eran transfectadas con el amplicón pOGFP la fluorescencia directa no se podía detectar (**Figura 30, foto 1**), atribuyendo esto a la poca intensidad de la fluorescencia mostrada por las construcciones que poseen el péptido señal (pZRHEGFP, pOGFP y D3).

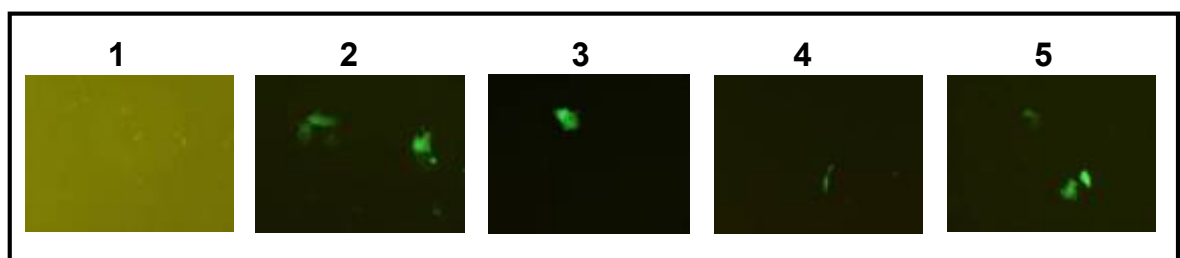


Figura 30. Expresión celular de la EGFP con un comportamiento α : Células Vero transfectadas con 4 μ g de DNA de los amplicones: pOGFP (foto 1); pOGF-SD (foto 2); pOGF-SD4 (foto 3); pOSD4-AG (foto 4); pORIPAC-GF (foto 5).

Para eliminar factores celulares relacionados con la presencia de fluorescencia en células Vero se transfectaron células 293T, por el método de fosfato cálcico (Abad et al., 2002), tanto con plásmidos como con amplicones, observando de nuevo el mismo comportamiento: ni con el plásmido ni con el amplicón que tienen el péptido señal, es decir pZRHEGFP y pOGFP, se observó fluorescencia (**Figura 31, panel A foto1; panel B foto 1, respectivamente**); pero con los otros plásmidos y amplicones (que no tienen el péptido señal), es decir pZGF-SD4, pSD4-AG, pOGF-SD4 y pOSD4-AG, si se detectó fluorescencia (**Figura 31, panel A fotos 2 y 3; panel B fotos 2 y 3**).

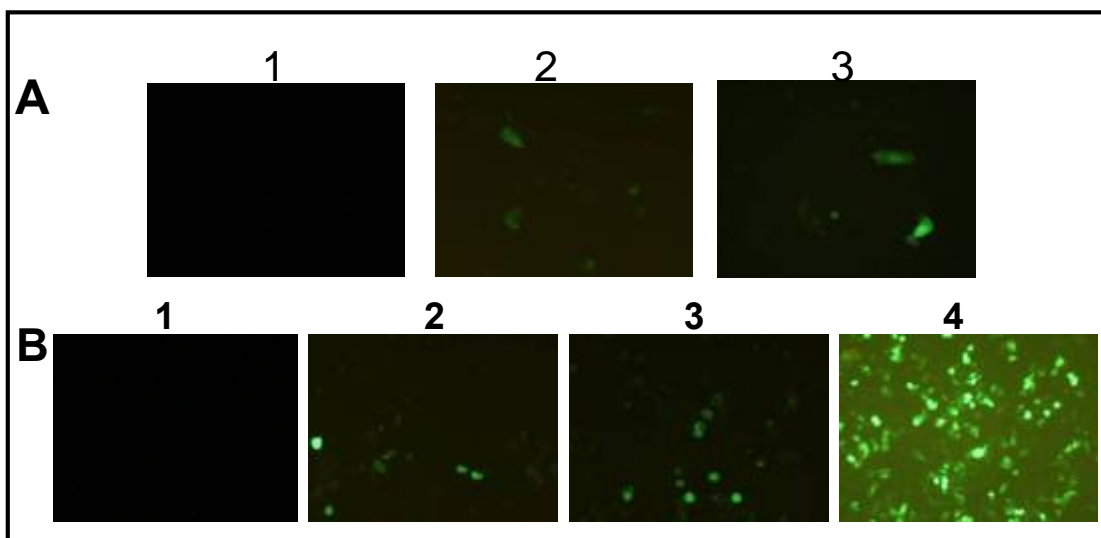


Figura 31. Expresión de la EGFP bajo el control del promotor gG por plásmidos y amplicones. Células 293T transfectadas. **Panel A:** con 10 μ g de los plásmidos: pZRHEGFP (1); pZGF-SD4 (2); pSD4-AG (3). **Panel B:** con 10 μ g de los amplicones: pOGFP (1); pOGF-SD4 (2); pOSD4-AG (3); pORIPAC-GF (4).

Con los extractos celulares totales, obtenidos a partir de las transfecciones en células 293T, se realizó “Western blot” frente a la EGFP, pero tan solo se detectó expresión en el pORIPAC-GF; atribuyendo esto a que con el amplicón pOGFP no era observada ninguna célula fluorescente y con los amplicones pOGF-SD4 y pOSD4-AG tan sólo eran observadas de un 10% a un 20% de células fluorescentes (**Figuras 30 y 31**), por lo tanto no detectables por WB con el anticuerpo empleado (ANTI-GFP, BD Biosciences Clontech) (datos no mostrados).

4.2.1.1. Estudio comparativo entre el promotor gG y el promotor IE180.

Se transfectaron células Vero por el método de lipofectamina (Invitrogen) con los plásmidos pSD4-AG (con la EGFP bajo el control gG de PRV) (apartado 4.1.13), p180FG (que expresa la EGFP bajo el control del promotor IE180) (apartado 4.1.14) y pEGFP-N1 (que expresa la EGFP bajo el control del pCMV) (Clontech), con el fin de comparar el nivel de expresión de dicha proteína cuando su actividad es regulada por el promotor gG, que presenta algo de actividad inmediatamente temprana, frente a su expresión cuando es

regulada por promotores con una actividad inmediatamente temprana verdadera, tales como el promotor IE180 de PRV o el promotor de CMV.

La expresión de la EGFP fue valorada cualitativamente por su detección al microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TS100) 48 horas después de la transfección (**Figura 32, panel B**) y cuantitativamente por citometría de flujo (FACSCAN, Beckton Dickinson) (**Figura 32, panel A**) por medio de la cual se evidenció que el plásmido pSD4-AG (**Figura 32, muestra 2**) si que expresa la EGFP pero a niveles inferiores (aproximadamente 3 veces menos) en comparación con el plásmido p180FG (**Figura 32, muestra 3**) y aproximadamente 10 veces menos en comparación con el plásmido pEGFP-N1 (**Figura 32, muestra 4**), por lo tanto el promotor más activo en la expresión de la EGFP fue el pCMV.

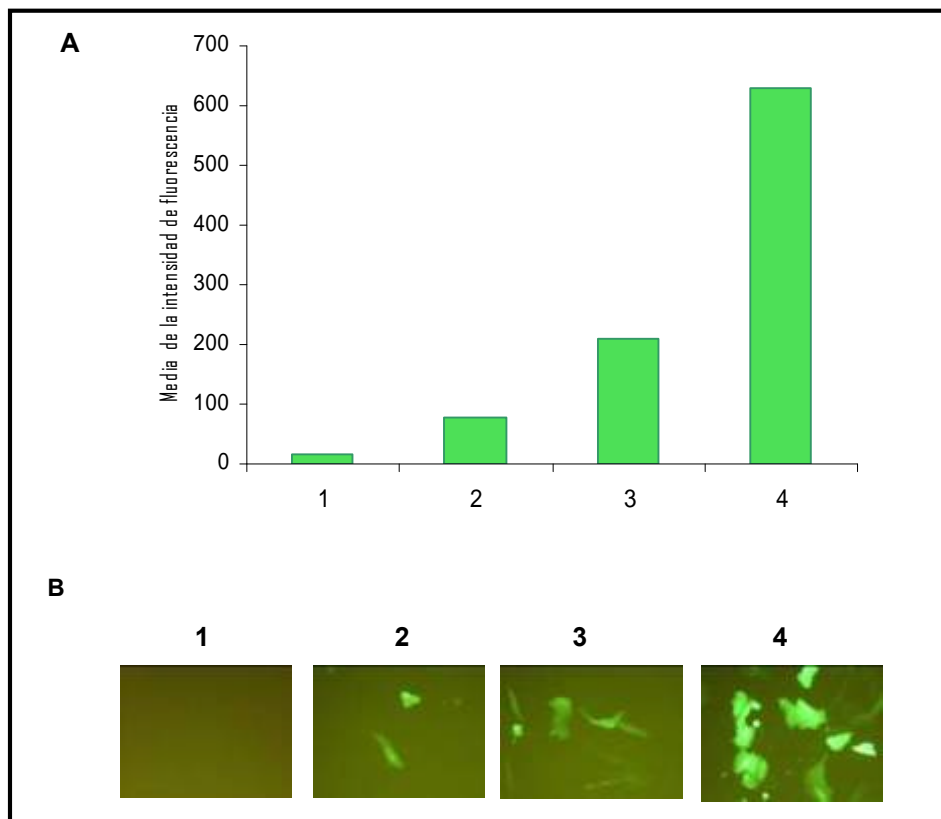


Figura 32. Comparación de la expresión de la EGFP bajo el control de diferentes promotores. Control negativo (células Vero sin transfectar) (1), pSD4-AG (2), p180FG (3), pEGFP-N1 (4). Citometría de flujo (Panel A) y examen microscópico 48 h pos-transfección (panel B).

4.2.2. CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DEL PROMOTOR gG DE PRV COMO GEN IE POR MEDIO DE VIRUS RECOMBINANTES

El promotor de la gG de PRV está definido como un promotor temprano, (Kovacs & Mettenleiter, 1991, Mettenleiter & Rauh, 1990, Thomsen et al., 1987a), pero después de las transfecciones en células Vero y 293T (apartado 4.2.1) se observó que la EGFP bajo este promotor se expresa como una proteína inmediatamente temprana.

Dado que el promotor gG de PRV es un promotor fuerte y de gran interés para la expresión de proteínas foráneas utilizando el PRV como vector, se decidió continuar estudiando el comportamiento de dicho promotor durante la expresión de los genes víricos. Motivo por el cual se construyeron diferentes tipos de virus recombinantes que expresarían como proteína marcadora la EGFP bajo el control del promotor gG. Para ello, previamente, se construyeron los plásmidos (4.1.1) necesarios para hacer la recombinación homóloga y para la construcción de los amplicones (4.1.2), empleados para confirmar la expresión de la EGFP.

La estrategia para la obtención de cada uno de los virus recombinantes consistió primero en construir un plásmido que tuviese las zonas de recombinación homóloga localizadas flanqueando el gen gE de PRV, como proteína marcadora la EGFP bajo el control del promotor gG y como vector el pUC18. Una vez caracterizados estos plásmidos, el “cassette” de zonas de recombinación- promotor- EGFP y poli A, era clonado en el amplicón pORIPAC (Prieto et al., 2002) para verificar la correcta expresión la EGFP tanto por detección de la fluorescencia por medio del microscopio (Nikon Eclipse TS100) equipado con filtro FITC, como por “Western blot”. Después de hacer esta verificación el mismo “cassette” utilizado para la obtención de los amplicones era utilizado para obtener propiamente los virus recombinantes mediante recombinación homóloga con el virus parental gIS8 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) la estrategia seguida se resume en la **Figura 33**.

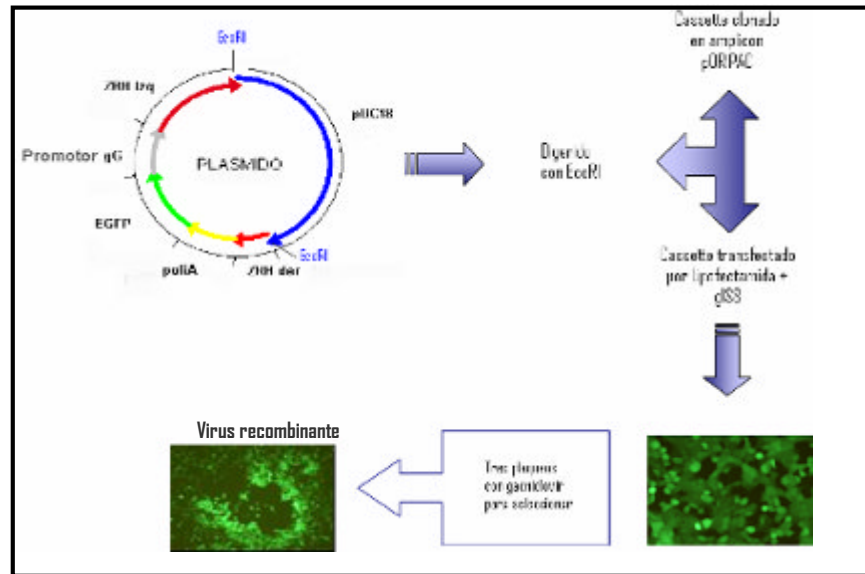


Figura 33. Diagrama: Estrategia para la obtención de virus recombinantes.

4.2.2.1. Obtención y caracterización de virus recombinantes

Los virus recombinantes de PRV son vectores que actualmente se están estudiando para ser empleados como agentes en terapia génica (Boldogkoi & Nogradi, 2003, Shiau et al., 2007), para el desarrollo de nuevas cepas vacunales (Jiang et al., 2007, Yin et al., 2007) y sobre todo para el desarrollo de cepas vacunales gE negativas (Hong et al., 2007).

La estrategia para la obtención de los virus recombinantes de este estudio consistió en digerir los DNAs plasmídicos con *EcoRI* (el mismo “cassette” utilizado para la construcción de los amplicones) y su posterior transfección por el método de lipofectamina (Invitrogen) en células Vero, junto con el virus parental gIS8. Los virus recombinantes fueron seleccionados y purificados por tres plaques sucesivos en agar noble en presencia de ganciclovir (apartado 3.2.5). En cada plaqueo se seleccionaban aquellos clones que en la mayor dilución fuesen fluorescentes y que estuviesen lo más posiblemente separados de clones no fluorescentes, la estrategia se esquematiza en la **Figura 33**, apartado 4.2.2. En la **Figura 41** se esquematiza el genoma de cada uno de los virus parentales y recombinantes empleados en este estudio.

4.2.2.1.1. Obtención del virus recombinante D3

El virus recombinante D3 se obtuvo por recombinación homóloga entre el virus parental gIS8, previamente diseñado en el laboratorio (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) y el fragmento de 3152nt, obtenido al digerir el plásmido pZRHEGFP (apartado 4.1.1.1) con la enzima *PvuII* y que contiene las zonas de recombinación homóloga- promotor gG- péptido señal-EGFP- poli A de la TK de HSV-1. La transfección del DNA del virus gIS8 y el fragmento de 3152nt, fue realizada por el método de lipofectamina (Invitrogen) sobre células Vero. El virus D3 fue clonado y purificado mediante tres plaqueos en células Vero en presencia de ganciclovir. Es de resaltar que los clones obtenidos a partir del plásmido pZRHEGFP mostraban una intensidad de la fluorescencia mucho menor que los otros virus recombinantes obtenidos a partir de los plásmidos sin péptido señal (**Figura 34, panel A**) y que esta disminución en la intensidad de la fluorescencia también fue observada cuando el plásmido pZRHEGFP o el amplicón pOGFP eran transfectados junto con un virus cooperador.

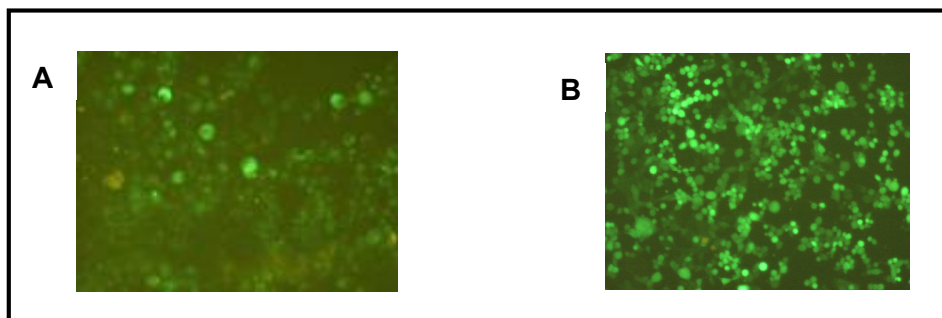


Figura 34. Comparación de la expresión de EGFP celular entre los virus D3 y S3. Células Vero infectadas con: **Panel A.** virus recombinante D3; **panel B.** virus recombinante S3.

4.2.2.1.2. Obtención del virus recombinante Z1

El virus recombinante Z1 se obtuvo por recombinación homóloga entre el virus parental gIS8 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) y el fragmento de 3541nt del plásmido pZGF-SD.

El fragmento de 3541nt fue obtenido al digerir el plásmido pZGF-SD (apartado 4.1.1.2) con la enzima *EcoRI*. La transfección del DNA viral del gIS8 y el DNA plasmídico digerido, fue realizada por el método de lipofectamina (Invitrogen) sobre células Vero. El virus Z1 fue clonado y purificado mediante tres plaqueos en células Vero en presencia de ganciclovir. La intensidad de la fluorescencia observada en el virus Z1 es similar a la observada en el virus S3 (**Figura 34**).

4.2.2.1.3. Obtención del virus recombinante S3

El virus recombinante S3 se obtuvo por recombinación homóloga entre el virus parental gIS8 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) y el fragmento de 3541nt del plásmido pZGF-SD4, sustituyendo así la quimera α 4TK del virus recombinante gIS8.

En el fragmento de 3541nt está incluido el “cassette” que contiene la EGFP bajo el control del promotor gG de PRV y el poli A de SV40, flanqueado por las zonas de recombinación homóloga. Este “cassette” fue obtenido al digerir el plásmido pZGF-SD4 (apartado 4.1.1.2) con la enzima *EcoRI*. La transfección del DNA viral del gIS8 y el DNA plasmídico digerido, fue hecha por el método de lipofectamina (Invitrogen) sobre células Vero. El virus S3 fue clonado y purificado mediante tres plaqueos sucesivos en presencia de ganciclovir, utilizando como proteína marcadora la EGFP (**Figura 35, panel B**).

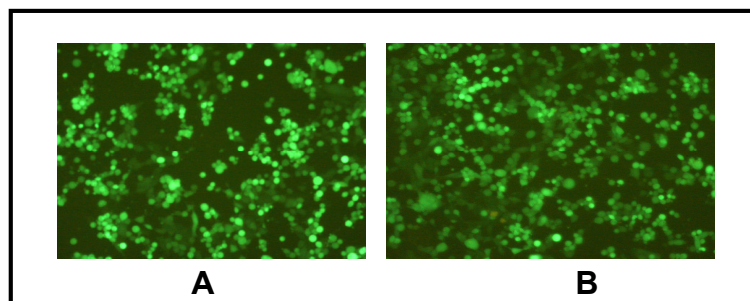


Figura 35. Comparación de expresión de la EGFP entre los virus recombinantes Z1 y S3: células Vero infectadas con **Panel A.** Virus recombinante Z1; **panel B.** Virus recombinante S3.

4.2.2.1.4 Caracterización de los virus recombinantes Z Y S

Se obtuvieron varios clones, pero por su mayor título, fueron seleccionados dos de cada grupo (Z1, Z5 y S1, S3). Los DNAs virales fueron obtenidos mediante gradiente de ioduro sódico (Walboomers & Schegget, 1976), posteriormente se digirieron con las enzimas *Bspl* y *HpaI*, se separaron los fragmentos por electrofóresis, para realizar “Southern blot” utilizando la sonda EGFP (región que va desde el nucleótido 746 hasta el nucleótido 1289 en la secuencia del plásmido pEGFP-N1) marcada con (^{32}P)-dCTP. Por “Southern blot” se evidenció que los virus recombinantes del grupo Z y del grupo S habían incorporado el gen de la EGFP (**Figura 36, panel B carriles 5, 6, 7 y 8**), son comparados frente a la cepa “wild type” de PRV y al virus parental gIS8 que no tienen el gen de la EGFP (**Figura 36, panel B carriles 3 y 4**). A pesar de la mutación mencionada en el plásmido original de los virus recombinantes Z, es decir el pZGF-SD, no se observó ninguna diferencia apreciable a nivel biológico (intensidad de la fluorescencia, capacidad de infectar y morfología de las células infectadas).

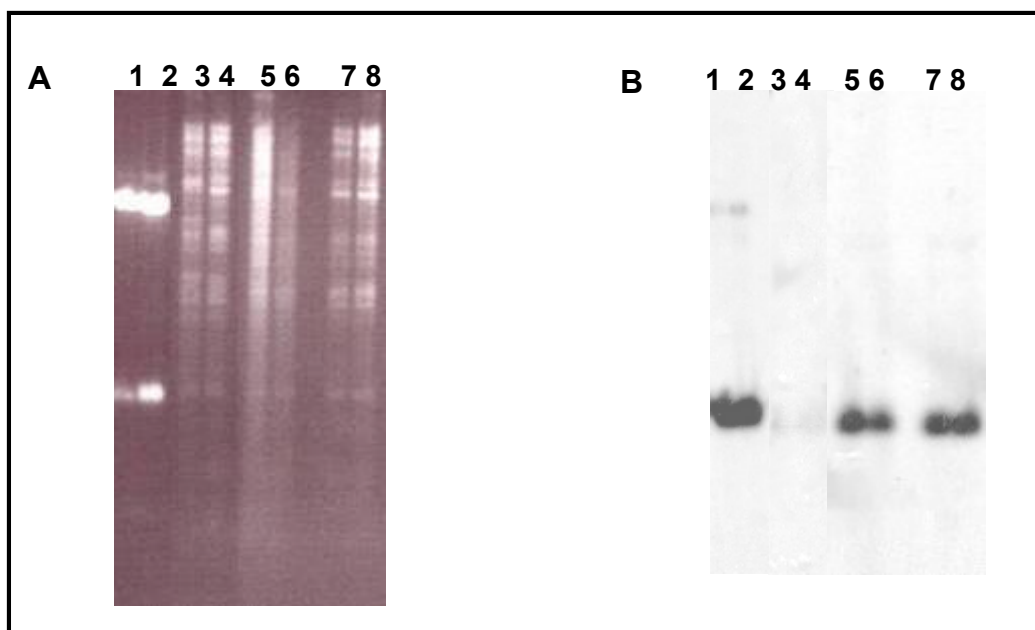


Figura 36. Caracterización de los virus recombinantes Z y S: Panel A. Electrofóresis de DNAs virales digeridos. Gel al 0,75% antes de ser transferido a membrana de nylon. **Panel B. “Southern blot” de DNAs virales frente a la EGFP.** pZGF-SD (carril 1); pZGF-SD4 (carril 2); NIA-3(carril 3); gIS8 (carril 4); S1 (carril 5); S3(carril 6); Z1(carril 7); Z5 (carril 8).

4.2.2.1.5. Obtención del recombinante R10

El virus recombinante R10 se obtuvo por recombinación homóloga entre el virus parental gIS8 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) y el fragmento de 3355nt del plásmido pSD4-AG, sustituyendo así la quimera α 4TK del virus recombinante gIS8.

El fragmento de 3355nt fue obtenido por digestión del plásmido pSD4-AG (apartado 4.1.1.3) con la enzima *EcoRI* y fue transfectado junto con el virus parental gIS8 en células Vero por el método de lipofectamina. El virus R10 fue clonado y purificado mediante tres plaques sucesivos en presencia de ganciclovir, como se describe en el apartado 3.2.5. La intensidad de la fluorescencia producida por el virus R10 fue similar a la producida por el virus S3 (**Figura 37**).

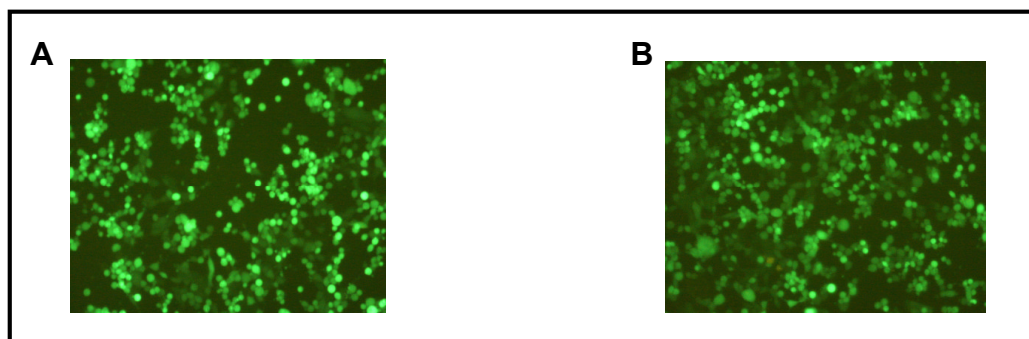


Figura 37. Comparación de expresión de la EGFP entre los virus recombinantes R10 y S3: en células Vero infectadas con **panel A.** virus recombinante R10; **panel B.** Virus recombinante S3.

4.2.2.1.5.1. Caracterización del virus recombinante R10

El DNA del virus R10 fue caracterizado por “Southern blot” comparándolo con los virus D3 y S3. Los DNA víricos fueron aislados por el método de gradiente de ioduro sódico (Walboomers & Schegget, 1976), digeridos con las enzimas de restricción *BspEI* y *AspI*, separados por electroforesis y analizados por “Southern blot” con la sonda EGFP (región que va desde el nucleótido 746 hasta el nucleótido 1289 de la secuencia del

plásmido pEGFP-N1), marcada con (32 P)-dCTP. En la **Figura 38, panel B, carriles 5, 6 y 7** se observa que los virus recombinantes D3, S3 y R10 han incorporado el gen de la EGFP y en la **Figura 39, panel B, carriles 1, 2 y 3** donde los mismos DNAs virales han sido digeridos con *KpnI* y posteriormente hibridados con la sonda TK de HSV-1 (región que va desde el nucleótido 102, después del ATG de la TK de HSV-1, hasta el nucleótido 581) se observa que los virus recombinantes han perdido el gen de la TK de HSV-1 y que por el contrario dicho gen sí está presente en el virus parental gIS8, como era de esperar (**Figura 39, panel B, carril 4**).

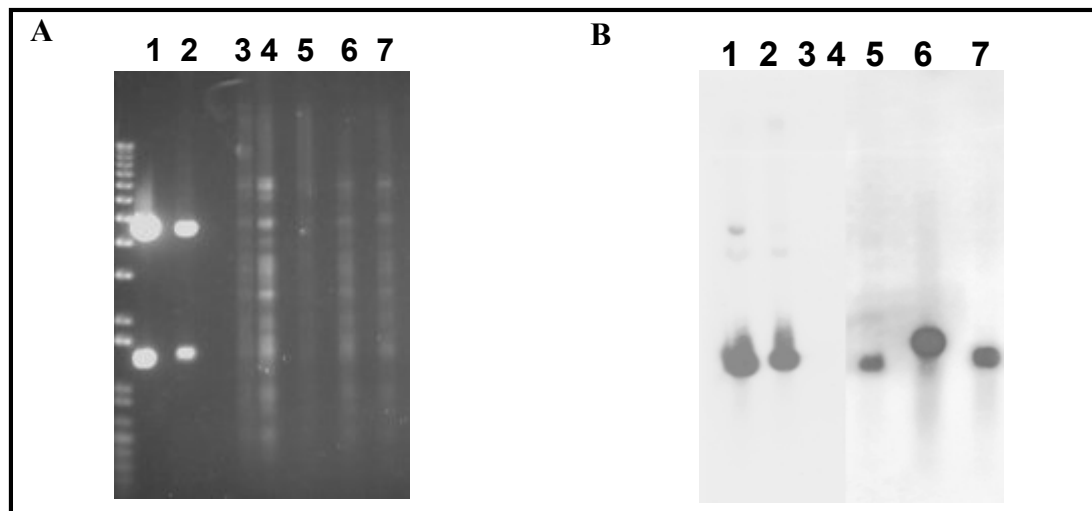


Figura 38. Caracterización del virus recombinante R10. Panel A. Electroforesis de DNAs virales digeridos. Gel al 0,75% antes de ser transferido a membrana de nylon. **Panel B. “Southern blot” de los DNAs virales frente a la EGFP.** pZRHEGFP (carril 1) ; pSD4-AG (carril 2) ; gIS8 (carril 3) ; NIA-3 (carril 4) ; D3 (carril 5) ; S3 (carril 6); R10 (carril 7).

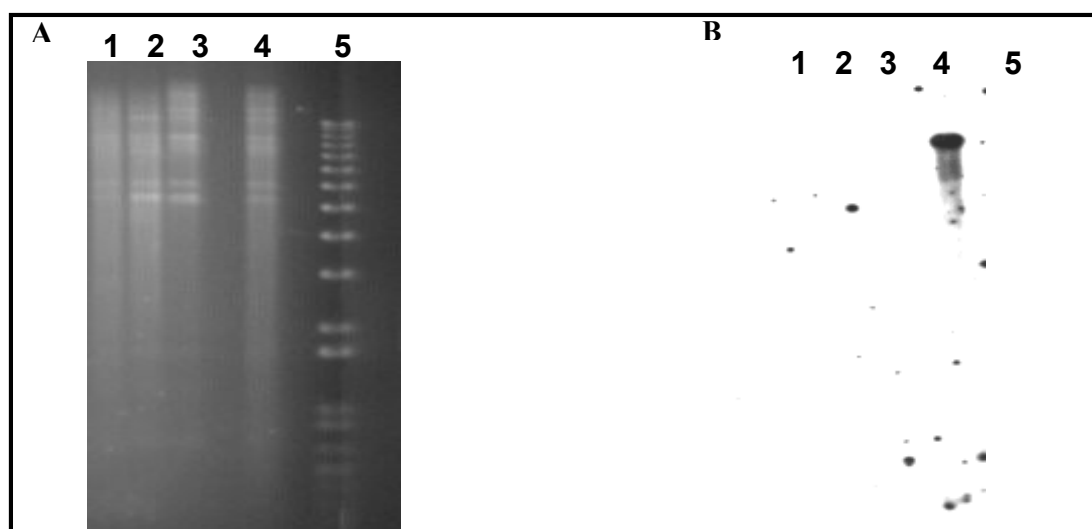


Figura 39. Caracterización virus recombinante R10. Panel A. Electroforesis de DNAs virales. Gel al 0,75% antes de transferir a membrana de nylon. **Panel B. “Southern blot” de los DNAs virales frente a la TK de HSV-1,** DNA virus D3 (carril 1); DNA virus S3 (carril 2); DNA virus R10 (carril 3); DNA virus gI8 (carril 4), marcador de tamaños (carril 5).

4.2.2.1.6. Obtención y caracterización de virus recombinantes gG negativos

Con el objetivo de tener un control negativo para la expresión de la gG, se obtuvieron dos tipos de virus recombinantes más denominados XGF-G y XGF-N, estos virus han incorporado el gen de la EGFP en el lugar del gen gG, usando como virus parentales al gI8 y al NIA-3, respectivamente.

El virus recombinante XGF-G se obtuvo por recombinación homóloga, al transfectar células Vero por el método de lipofectamina, entre el virus parental gI8 (Férrandez et al., 1999, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) y el fragmento de 1627nt obtenido de digerir el plásmido pSD4-AG con las enzimas de restricción *XhoI* y *MluI*, región que corresponde a las zonas de recombinación homóloga en la gG de PRV y a la región codificante de la EGFP bajo el promotor gG. El virus XGF-G fue clonado y purificado mediante tres plaqueos sucesivos, como se describe en el apartado 3.2.5. La selección de los clones se hacía por la presencia de fluorescencia, de este modo se seleccionaron 5 clones que se caracterizaron por PCR evidenciando que no tenían el gen de la gG y si que tenían el gen de la EGFP (**Figura 40, panel A líneas 1 a la 5**), se seleccionó el clon 5 por tener mayor título.

El virus recombinante XGF-N se obtuvo por recombinación homóloga, al transfectar células Vero por el método de lipofectamina (Invitrogen), entre el virus parental NIA-3 (McFerran & Dow, 1975) y el fragmento de 1627nt obtenido de digerir el plásmido pSD4-AG con las enzimas de restricción *XhoI* y *MluI*, región que corresponde a las zonas de recombinación homóloga en la gG de PRV y a la región codificante de la EGFP. El virus XGF-N fue clonado y purificado mediante tres plaqueos sucesivos como se describe en el apartado 3.2.5. La selección de los clones se hacía por la presencia de

fluorescencia, seleccionando el clon 1 por tener mayor título (**Figura 40, panel A línea 6**).

La intensidad de la fluorescencia observada en los virus recombinantes XGF-G y XGF-N es similar a la observada en el virus recombinante S3 (**Figura 40, panel B**).

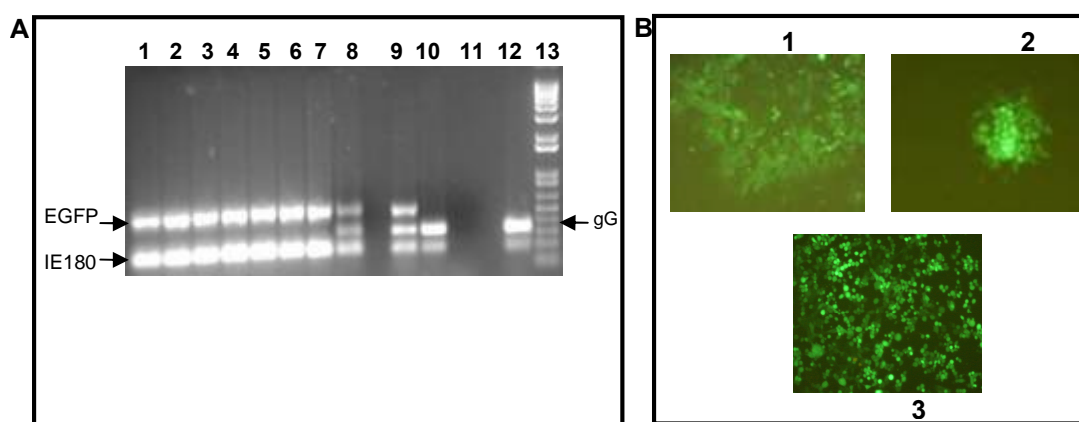


Figura 40. Panel A. Caracterización de virus recombinantes XGF-N y XGF-G. PCR multiplex con los iniciadores: GFPult/GF-R, gG-D/gG-R y 180-D/180-R. Clon XGF-G-1(carril 1); Clon XGF-G-2 (carril 2); Clon XGF-G-3 (carril 3); Clon XGF-G-4 (carril 4); Clon XGF-G-5 (carril 5); Clon XGF-N-1 (carril 6); Clon XGF-N-2 (carril 7); Clon XGF-N-3 (carril 8); pBecker2-GF (carril 9); gIS8 (carril 10); Control negativo (carril 11); NIA-3 (carril 12); marcador de tamaños (carril 13). **Panel B. Comparación de expresión de la EGFP celular entre los virus recombinantes XGF-N, XGF-G y S3:** en células Vero infectadas con: virus recombinantes XGF-G (foto 1), XGF-N (foto 2) y S3 (foto 3).

En el siguiente esquema se puede observar la estructura del genoma de los diferentes virus recombinantes obtenidos y la ubicación de la proteína marcadora (EGFP) (**Figura 41**).

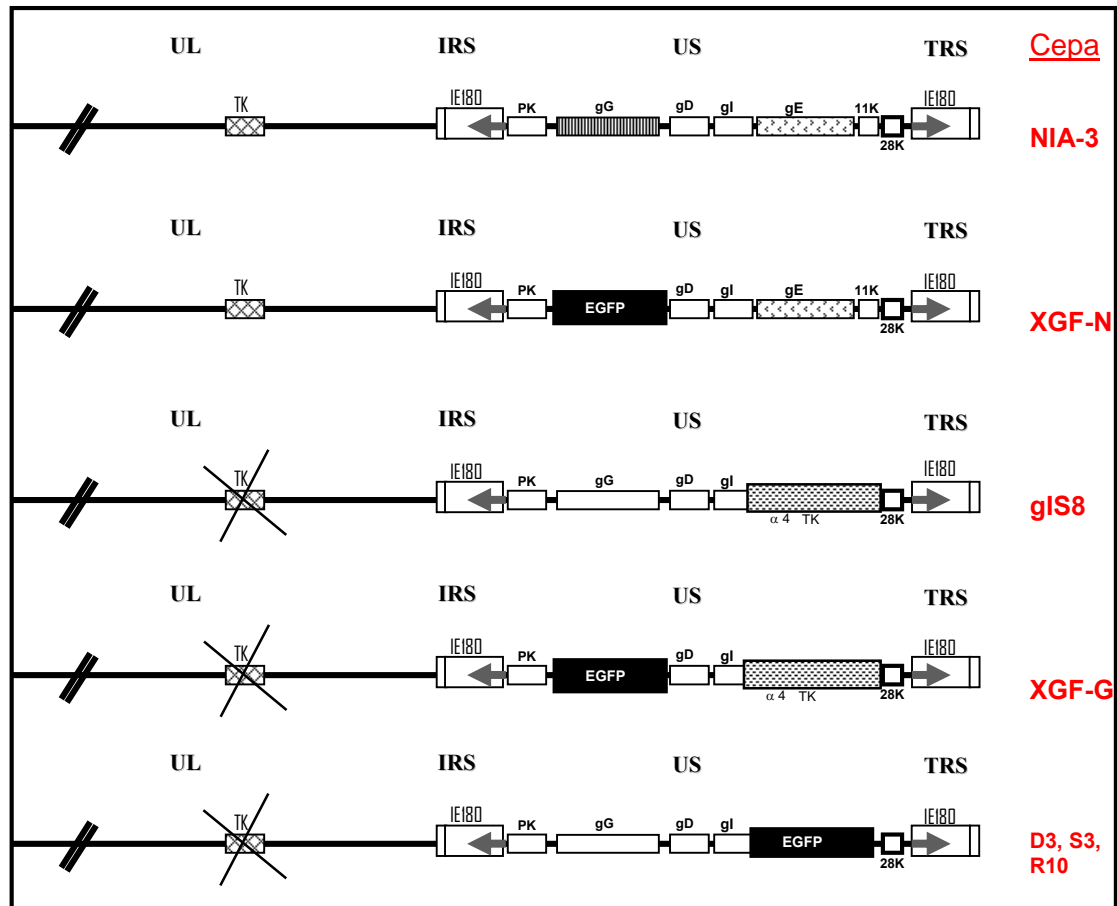


Figura 41. Diagrama esquemático del genoma de los virus recombinantes.

4.2.2.2. Expresión de la EGFP y la gG bajo el control del promotor gG de PRV por medio de virus recombinantes

Para confirmar que la EGFP bajo el promotor gG de PRV se estaba comportando como una proteína inmediatamente temprana se decidió analizar los extractos de la infección a niveles inmediatamente tempranos y tempranos de los virus recombinantes XGF-N y X-GF-G (virus deficientes en el gen gG y con la EGFP bajo el promotor gG), D3, S3 y R10 (virus recombinantes que expresan la EGFP bajo el promotor gG, además de expresar su propia gG) (la obtención y caracterización de estos virus se describe en el apartado 4.2.2.1).

La expresión de los mRNAs de los virus recombinantes se estudió a nivel de mRNAs inmediatamente tempranos (α) acumulados en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas, cicloheximida (CHX) (Sigma), y

traducidos con actinomicina D (ActD) (Sigma) y además se estudió la expresión de los mRNAs a niveles tempranos (β) usando como inhibidor de la replicación el ácido fosfonoacético (PAA) (Sigma).

En la infección de células Vero con los virus recombinantes XGF-N, XGF-G, D3, S3 y R10 en presencia de CHX no se observa expresión de la proteína fluorescente por parte de ninguno de los virus (**Figura 42, línea A**), estas mismas células son lavadas y posteriormente incubadas con ActD para producir la traducción de estos mRNAs acumulados y dos horas después ya se empieza a observar fluorescencia en las células infectadas por los cinco virus, pero en las células infectadas con el virus D3 la intensidad de la fluorescencia observada es menor debido a la influencia del péptido señal, en la **Figura 42, línea B** se observan fotografías tomadas 4 horas pos-incubación con ActD indicando que la EGFP bajo el control del promotor gG se comporta como una proteína inmediatamente temprana ya que se observa la presencia de células fluorescentes. En la infección de células Vero con cada uno de los virus recombinantes en presencia de PAA se observa que hay mayor fluorescencia, habiendo mayor actividad a niveles tempranos, pero con algo de actividad a niveles inmediatamente tempranos (**Figura 42, línea C**).

Esta actividad también fue confirmada analizando la expresión de la EGFP, bajo el control del promotor gG, y la expresión de la propia gG mediante "Western blot".

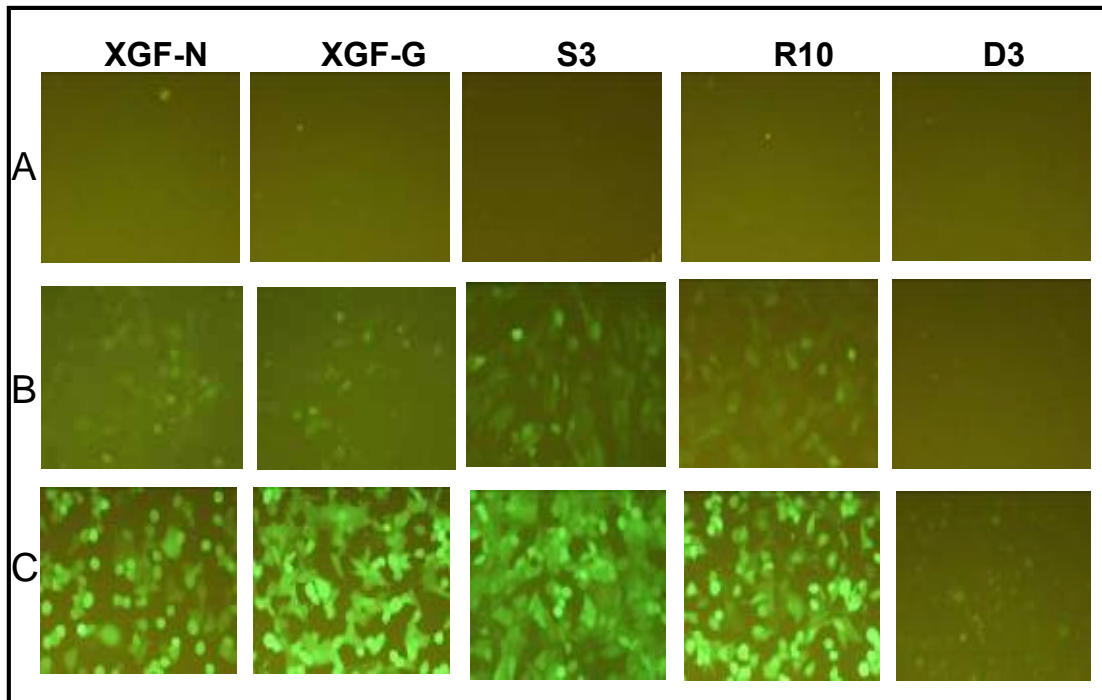


Figura 42. Síntesis de la EGFP por los virus recombinantes XGF-N, XGF-G, S3, R10, D3. Células Vero infectadas **A.** tratadas con 100mM de CHX durante 12 horas; **B.** Visualización de proteínas inmediatamente tempranas tras incubación 4 horas con Actinomicina D a 10mg/ml pos-eliminación de CHX. **C.** Visualización de proteínas tempranas después de 16h de incubación en presencia de ácido fosfonoacético.

4.2.2.2.1. Expresión de la IE180 de PRV

Con los extractos celulares totales obtenidos después de esta infección se realizó “Western blot” frente a la proteína IE180, como control, ya que es la única proteína inmediatamente temprana de PRV usando un anticuerpo, previamente obtenido en nuestro laboratorio, que reconoce la región aminoterminal de la proteína IE180 (Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004). Se vio una mayor respuesta de los extractos obtenidos en presencia de CHX – ActD a niveles α en comparación con la respuesta observada por los extractos obtenidos en presencia de PAA a niveles β , confirmando que es una proteína inmediatamente temprana (**Figura 43**).

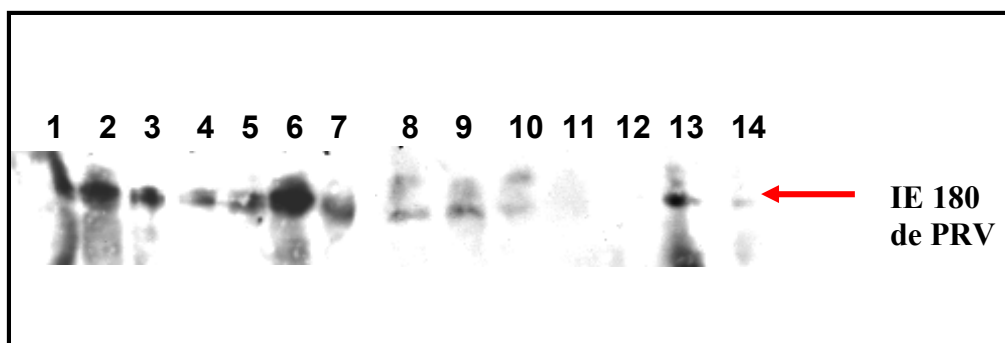


Figura 43. Inmunodetección de la IE180 a partir de extractos en presencia de inhibidores. XGF-N en presencia de CHX-ActD (carril 1); XGF-G en presencia de CHX-ActD (carril 2); NIA-3 en presencia de CHX-ActD (carril 3); gIS8 en presencia de CHX-ActD (carril 4); S3 en presencia de CHX-ActD (carril 5); R10 en presencia de CHX-ActD (carril 6); D3 en presencia de CHX-ActD (carril 7); XGF-N en presencia de PAA (carril 8); XGF-G en presencia de PAA (carril 9); NIA-3 en presencia de PAA (carril 10); gIS8 en presencia de PAA (carril 11); S3 en presencia de PAA (carril 12); R10 en presencia de PAA (carril 13); D3 en presencia de PAA (carril 14). Frente al anticuerpo IE180 diluido 1:400.

4.2.2.2.2. Expresión de la EGFP

Con los extractos celulares totales obtenidos después de la infección de células Vero en presencia de inhibidores (**Figura 42**) se realizó un “Western blot” frente a la proteína EGFP usando el anticuerpo ANTI-GFP (BD Biosciences Clontech), confirmando lo observado por microscopia, es decir que la EGFP bajo el control del promotor gG de PRV muestra algo de actividad inmediatamente temprana pero su mayor actividad es a niveles tempranos, tanto en los virus recombinantes deficientes de gG (**Figura 44, carriles 1-2 y 8-9**) como en los otros virus recombinantes (**Figura 44, carriles 5- 6-7 y 12-13-14**). A partir del extracto del virus recombinante D3 no se detectó expresión a niveles inmediatamente tempranos de la EGFP debido a sus bajos niveles de expresión (**Figura 44, carril 7; Figura 42, foto B-D3**).

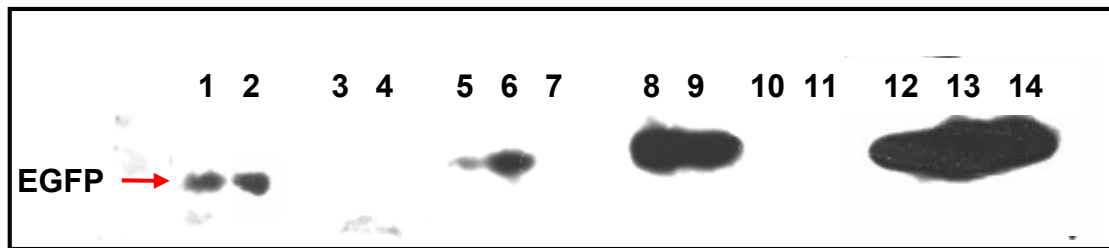


Figura 44. Inmunodetección de la EGFP a partir de extractos en presencia de inhibidores. XGF-N en presencia de CHX-ActD (carril 1); XGF-G en presencia de CHX-ActD (carril 2); NIA-3 en presencia de CHX-ActD (carril 3); gIS8 en presencia de CHX-ActD (carril 4); S3 en presencia de CHX-ActD (carril 5); R10 en presencia de CHX-ActD (carril 6); D3 en presencia de CHX-ActD (carril 7); XGF-N en presencia de PAA (carril 8); XGF-G en presencia de PAA (carril 9); NIA-3 en presencia de PAA (carril 10); gIS8 en presencia de PAA (carril 11); S3 en presencia de PAA (carril 12); R10 en presencia de PAA (carril 13); D3 en presencia de PAA (carril 14). Frente al anticuerpo EGFP (diluido 1:500).

4.2.2.2.3. Expresión de la gG de PRV

Con el fin de tener anticuerpos frente a la gG para su posterior utilización como reactivo en la detección de la expresión de la proteína gG por los virus recombinantes, se expresó la proteína en *E. coli* y se utilizó como antígeno en la inmunización de dos conejos.

4.2.2.2.3.1. Expresión de la proteína gG en *E.coli*

- Obtención del plásmido pRSTG1

Se obtuvo al clonar la región codificante de la proteína gG, sin transmembrana (aminoácidos 20 al 416, los cuales están incluidos en el fragmento *MscI*-*PmlI*), en el vector de expresión pRSETB (Invitrogen) en el sitio *PvuII* de la región de clonación del “polylinker”, resultando el plásmido pRSTG1, que se caracterizó por secuenciación, por medio de la cual se comprobó que la glicoproteína gG se encontraba en fase con el extremo aminoterminal del vector de expresión. En la caracterización por secuenciación se evidenció que la cepa NIA-3 presenta 12 sustituciones en relación con la cepa Kaplan (GenBank/EMBL/DDBJ AJ846266) produciendo tres cambios en la secuencia de aminoácidos (alanina por valina-posición 244; leucina por serina-posición 249 y treonina por isoleucina-posición 484 del polipéptido de la gG). Estas mutaciones fueron seis transiciones T-C (nucleótidos 72, 228, 426, 746, 957, 1176), cuatro transiciones C-T (nucleótidos 451, 731, 745, 1451), una transversión A-C (nucleótido 585) y una transversión G-C (nucleótido 1047).

-Inducción de la glicoproteína gG

Se electroporaron células *E. coli* Cepa BL21 (DE₃) pLysS con el plásmido pRSTG1, se seleccionó una colonia por su crecimiento resistente a ampicilina y a cloramfenicol, se creció en medio líquido, con los mismos antibióticos y se inició la inducción de la gG como se describe en el apartado 3.2.11. Cinco horas post-inducción con IPTG 1mM, las células fueron procesadas, obteniendo los cuerpos de inclusión y la fracción soluble, comprobando que la gG expresada formaba cuerpos de inclusión y que tiene un tamaño aproximado de 70.000 (**Figura 45, carril 3**) inferior al total de la proteína glicosilada que es de 95.000 (Rea et al., 1985).

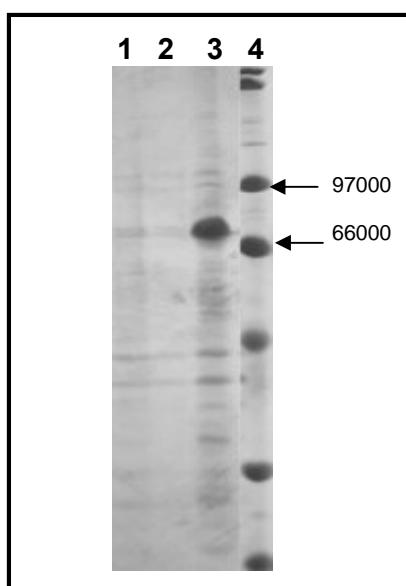
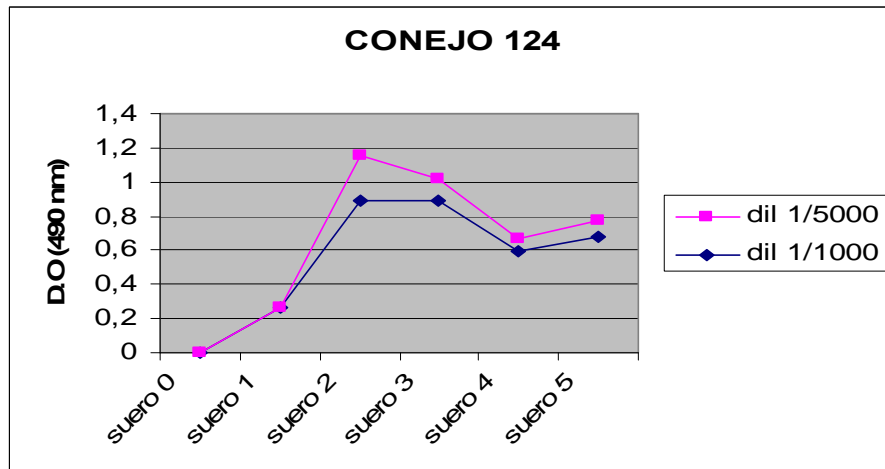


Figura 45. Inducción de la gG. Muestra antes de la inducción (carril 1); fracción soluble (carril 2); cuerpos de inclusión (carril 3); marcador de tamaños (carril 4).

4.2.2.2.3.2. Obtención de anticuerpos monoespecíficos frente a la glicoproteína gG de PRV

La obtención de anticuerpos monoespecíficos frente a la gG de PRV se realizó mediante inmunización de dos conejos (124 y 125) con la región codificante de la glicoproteína gG purificada mediante electrofóresis preparativa y electroelución. Los antisueros se caracterizaron por ELISA (**Figura 46**) y por “Western blot” (**Figura 47**).

A



B

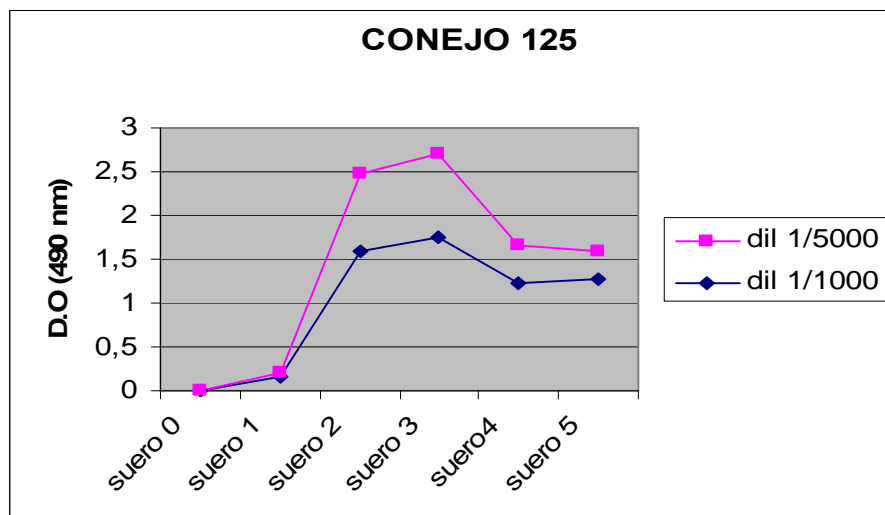


Figura 46. Caracterización de los sueros monoespecíficos frente a la glicoproteína gG de PRV mediante ELISA. Panel A. Sueros monoespecíficos obtenidos a partir del conejo 124; **Panel B.** Sueros monoespecíficos obtenidos a partir del conejo 125.

Se determinó la reactividad de los antisueros frente a la gG, mediante ELISA, utilizando como antígeno extracto total de células infectadas por PRV. El título de los antisueros (**Figura 46, paneles A y B, sueros 1 al 5**) fue aumentando con las sucesivas sangrías, comparado con el suero preinmune (**Figura 46, paneles A y B, suero 0**).

Por “Western blot” también se observó una respuesta específica concretamente del antisuero 3 obtenido, frente a la gG expresada tras la infección de células Vero por PRV (**Figura 47, carril 2**), se detectó algo de expresión en células Vero infectadas por el virus recombinante gIS8 con tratamiento de CHX-ActD (**Figura 47, carril 3**) lo que podía sugerir el comportamiento inmediatamente temprano de la expresión de la proteína. También se detectó expresión en células Vero infectadas por el virus recombinante gIS8 en presencia de PAA (**Figura 47, carril 4**).



Figura 47. Caracterización del antisuero monoespecífico número 3: frente a extractos de células Vero sin infectar (carril 1); infectadas con NIA-3 (carril 2); infectadas con gIS8-CHX+ActD (carril 3); infectadas con gIS8-PAA (carril 4). Antisuero diluido 1:1000.

4.2.2.2.3.3. Inmunodetección de la gG de PRV en virus recombinantes

La expresión de la gG fue estudiada, en los virus recombinantes, por detección de la glicoproteína gG por medio de “Western blot” usando el anticuerpo monoespecífico frente a la gG descrito en el apartado 4.2.2.2.3, donde se detectó, en los extractos de células Vero infectadas, la presencia de tres bandas predominantes originadas por digestiones proteolíticas y otras modificaciones pos-transcripcionales tales como la sulfación o la glicosilación (Bennett et al., 1986, Thomsen et al., 1987b). Por medio de este WB se confirmó que el promotor gG tiene algo de comportamiento inmediatamente temprano (**Figura 48**) tal como se había observado previamente en el WB frente a la EGFP (**Figura 44**).

La gG tiene algo de expresión a niveles inmediatamente tempranos en células Vero infectadas con el virus “wild type” NIA-3 (**Figura 48, línea 3**), el virus parental gIS8 (**Figura 48, línea 4**), y los virus recombinantes S3 (**Figura 48, línea 5**), R10 (**Figura 48, línea 6**), D3 (**Figura 48, línea 7**), aunque mayoritariamente el nivel de expresión es a niveles tempranos. No se detectó expresión de la gG en fases inmediatamente tempranas ni tempranas en células Vero infectadas con los virus recombinantes deficientes en gG XGF-N (**Figura 48, líneas 1 y 8**) y XGF-G (**Figura 48, líneas 2 y 9**).

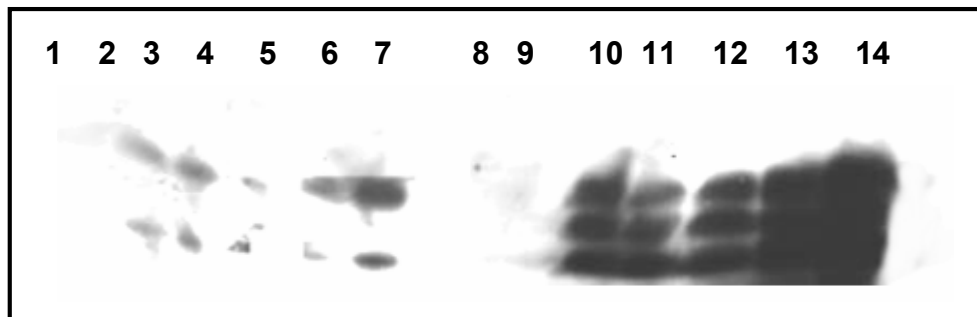


Figura 48. Inmunodetección de la gG a partir de extractos en presencia de inhibidores. XGF-N en presencia de CHX-ActD (carril 1); XGF-G en presencia de CHX-ActD (carril 2); NIA-3 en presencia de CHX-ActD (carril 3); gIS8 en presencia de CHX-ActD (carril 4); S3 en presencia de CHX-ActD (carril 5); R10 en presencia de CHX-ActD (carril 6); D3 en presencia de CHX-ActD (carril 7); XGF-N en presencia de PAA (carril 8); XGF-G en presencia de PAA (carril 9); NIA-3 en presencia de PAA (carril 10); gIS8 en presencia de PAA (carril 11); S3 en presencia de PAA (carril 12); R10 en presencia de PAA (carril 13); D3 en presencia de PAA (carril 14). Frente al anticuerpo gG (diluido 1:600).

4.2.3. INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR gG de PRV MEDIANTE LA INFECCIÓN por HSV-1

Se ha comprobado que la actividad del promotor gG es inhibida mediante la infección de HSV-1, al realizar coinfecciones con el virus S3 (virus recombinante de PRV, apartado 4.2.2.1.3) junto con la cepa virulenta F de HSV-1, o junto el virus mutante G2 (que no expresa ninguna región de la ICP4 de HSV-1) (Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) o junto el virus mutante d120 (expresa los primeros 150 aminoácidos de la ICP4 de HSV-1, que incluyen el dominio de transactivación) (DeLuca et al., 1984). Estas coinfecciones se realizaron tanto en células Vero (células no permisivas para los mutantes

defectivos en ICP4) como en células permisivas, E5 (células Vero que expresan la ICP4 de HSV-1) (DeLuca et al., 1985). 48 horas después de la doble infección las células se lisaban por sonicación para finalmente determinar la concentración total de virus por titulación (apartado 3.2.4) en células Vero y E5. La infección del virus recombinante S3 de PRV pudo ser evaluada por la expresión de la EGFP, expresada bajo el control del promotor gG, examinada directamente por el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TS100).

Cuando se coinfectaban células E5 con el virus recombinante S3 de PRV, a una M.O.I de 0,2, junto con el deficiente de HSV-1 G2 (a una M.O.I de 2,0) (**Figura 49, foto 1B**) o con el deficiente de HSV-1 d120 (a una M.O.I de 2,0) (**Figura 49, foto 1C**) se observa inhibición total de la producción virica del S3, evaluada por la ausencia de fluorescencia, indicando por lo tanto que el promotor gG no presenta actividad. Esta inhibición es dependiente de la M.O.I, porque a muy baja M.O.I (0,01), cuando las coinfecciones no han confluido aún, se observa algo de replicación de los dos virus (**Figura 49, fotos 2B y 2C**).

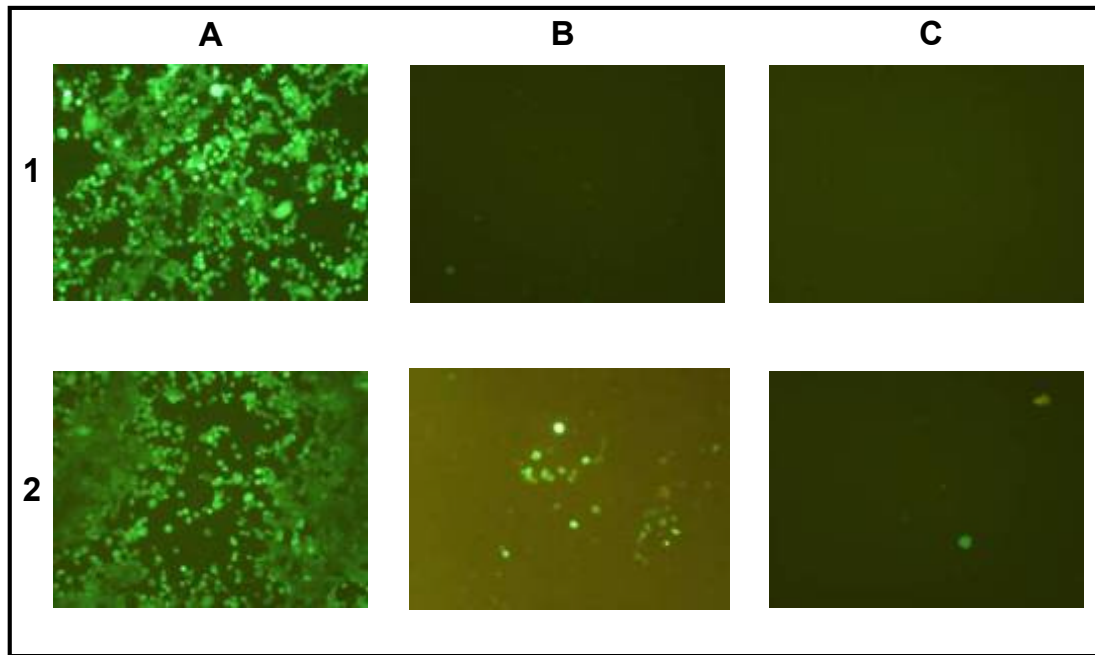


Figura 49. Replicación del virus S3 durante coinfección con el virus HSV-1 en células E5: Panel 1. A. S3 (M.O.I de 0,2); B. S3 (M.O.I de 0,2)+G2 (M.O.I de 2,0); C. S3 (M.O.I de 0,2)+d120 (M.O.I de 2,0). **Panel 2.** A. S3 (M.O.I de 0,01); B. S3 (M.O.I de 0,01)+G2 (M.O.I de 0,1); C. S3 (M.O.I de 0,01)+d120 (M.O.I de 0,1).

El título del virus recombinante S3 de PRV se ve disminuido al menos 2 logaritmos cuando éste es coinfectado con cualquiera de los dos mutantes de HSV-1 (**Figura 50, paneles A y B**) y esta disminución del título es mayor cuando la coinfección es realizada a una multiplicidad de infección mayor (**Figura 50, panel A**); sin embargo el título de los mutantes de HSV-1 no se ve alterado por la coinfección con PRV en células E5 (**Figura 50, paneles A y B**). Al infectar células Vero con los mutantes de HSV-1 deficientes en ICP4 existe un efecto citopático agudo, responsable de los títulos observados en éstas células que no son permisivas para el desarrollo de los mutantes (**Figura 50, paneles A y B**).

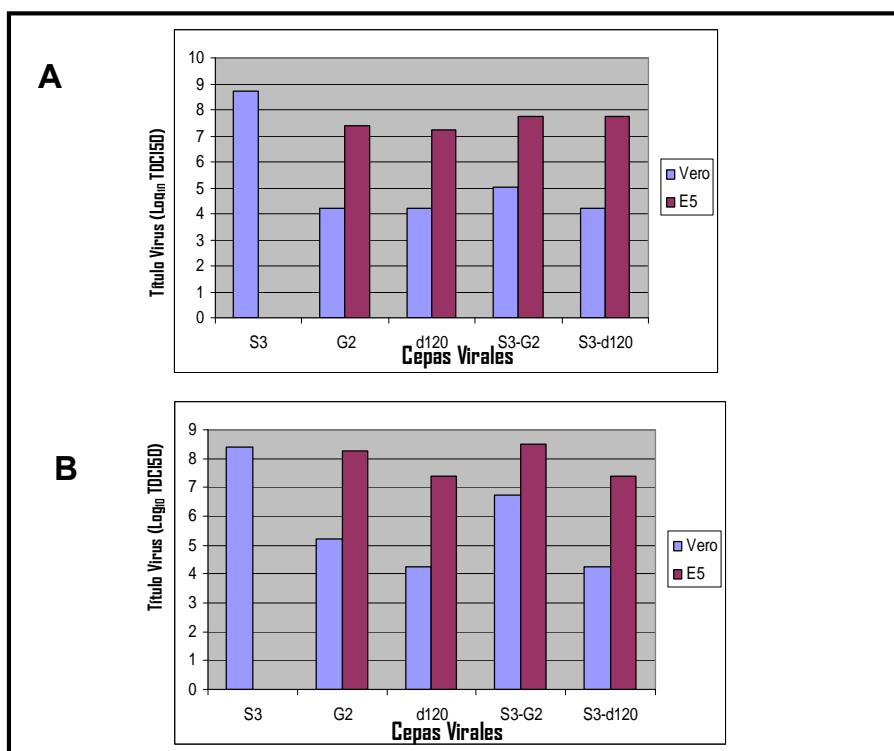


Figura 50. Producción de virus 48h después de las coinfecciones S3-HSV-1 en células E5. Panel A. infectadas con S3 (M.O.I de 0,2) y/o G2 (M.O.I de 2,0), d120 (M.O.I de 2,0). **Panel B.** Infectadas con S3 (M.O.I de 0,01) y/o G2 (M.O.I de 0,1), d120 (M.O.I de 0,1).

Al coinfectar células Vero (no permisivas para el desarrollo de los mutantes) con el virus recombinante S3 de PRV (a una M.O.I de 0,2), junto con los mutantes de HSV-1 deficientes en ICP4, G2 (a una M.O.I de 2,0) (**Figura 51, foto 1B**) o d120 (a una M.O.I de 2,0) (**Figura 51, foto 1C**) se observa interferencia en la replicación de PRV, quizá debida a los productos inmediatamente tempranos de HSV-1 producidos en células Vero, ya que éstas no son permisivas para la replicación vírica de los mutantes de HSV-1 (G2 y d120). La replicación vírica del virus S3 de PRV también fue completamente inhibida por la cepa virulenta F de HSV-1, ya que no se observó fluorescencia en la coinfección S3-F (**Figura 51, foto 1D**). El nivel de inhibición esta relacionado con la cantidad de virus PRV, porque a una M.O.I de 2,0 hay inhibición pero ésta no es completa y a una M.O.I de 0,2 la inhibición si que es completa (**Figura 51, líneas 1 y 2; figura 50, paneles A y B**).

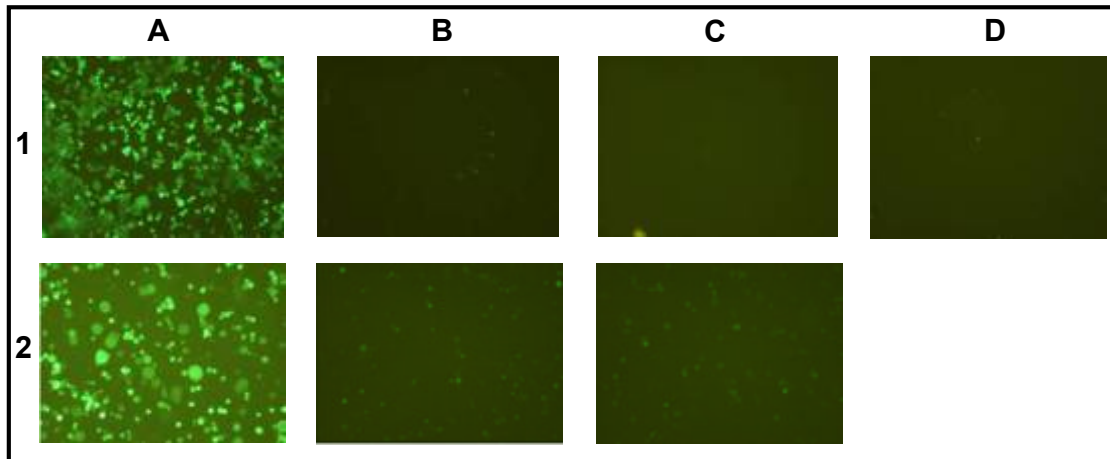


Figura 51. Replicación del virus S3 durante coinfección con el virus HSV-1 en células Vero: infectadas con: **Panel 1.** A. S3 (M.O.I de 0,2); B. S3 (M.O.I de 0,2)+G2 (M.O.I DE 2,0); C. S3 (M.O.I de 0,2)+d120 (M.O.I DE 2,0); D. S3 (M.O.I de 0,2)+F (M.O.I de 2,0). **Panel 2.** A. S3 (M.O.I de 2,0); B. S3 (M.O.I de 2,0)+G2 (M.O.I de 2,0); C. S3 (M.O.I de 2,0)+d120 (M.O.I de 2,0).

La región aminoterminal de la ICP4 parece jugar un papel importante en la inhibición de la replicación vírica del PRV porque el mutante G2, defectivo en toda la región ICP4, produce menor inhibición en la producción vírica del S3, que el mutante d120 que expresa la región aminoterminal de la ICP4 (**Figura 52, panel B**). La interferencia en la replicación de PRV fue debida a productos inmediatamente tempranos de HSV-1 ya que en células Vero (no permisivas para la replicación vírica de los mutantes de HSV-1: G2 y d120) también se observa inhibición en la replicación vírica (**Figuras 51 y 52**).

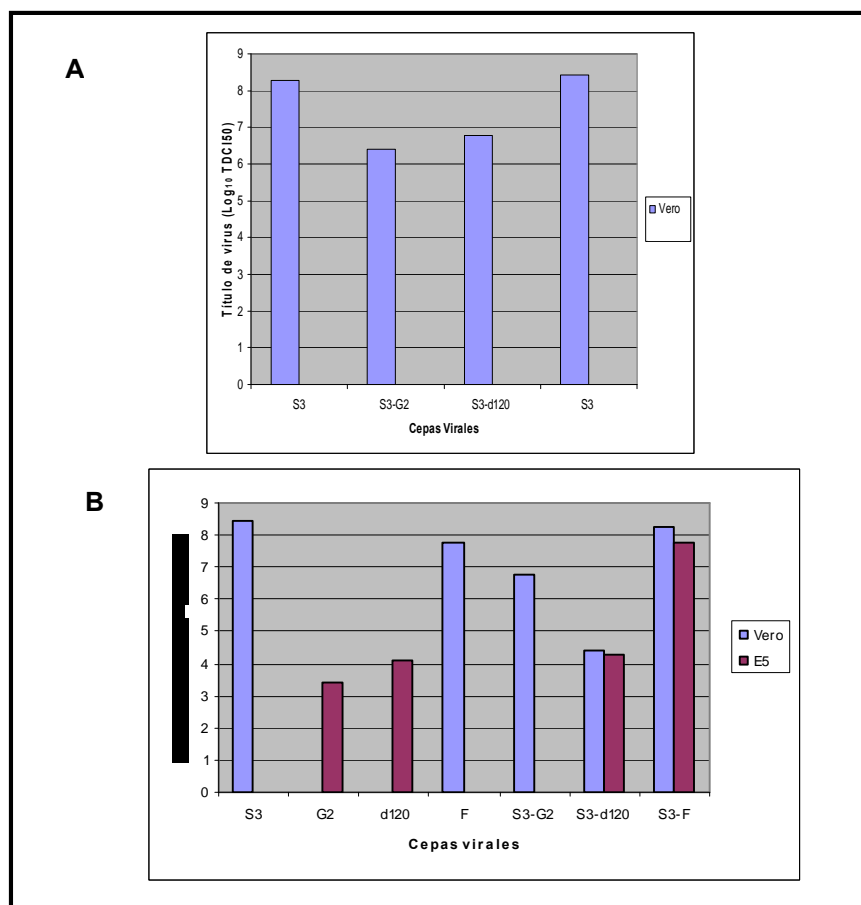


Figura 52. Producción de virus 48h después de las coinfecciones S3-HSV-1 en células Vero. Panel A. Infectadas con S3 (M.O.I de 2,0) y/o G2 (M.O.I de 2,0), d120 (M.O.I de 2,0). **Panel B.** Infectadas con S3 (M.O.I de 0,2) y/o G2 (M.O.I de 2,0), d120 (M.O.I de 2,0).

4.3. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS *pac* DEL VIRUS DE LA PSEUDORRABIA

Los motivos *pac* han sido implicados directamente en las funciones de corte del DNA concatomérico y su empaquetamiento. En PRV el dominio *pac1* tiene dos copias localizadas en los fragmentos *BamHI* 8' (*pac1* IR) y *BamHI* 13 (*pac1* TR). El dominio *pac2* tiene una copia localizada en el fragmento *BamHI* 14' (Harper et al., 1986, Rall et al., 1992) conformada por dos regiones de 82 nucleótidos repetidas e invertidas, localizadas en el genoma del nucleótido 3 al 84 (*pac2* D) y la otra del nucleótido 442 al 523 (*pac2* inv).

Para determinar la influencia de las secuencias *pac* en el proceso de empaquetamiento hemos construido BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) de PRV con diferentes deleciones en las secuencias de empaquetamiento, estos BACs a su vez han sido empleados en los estudios de obtención de amplicones libres de virus.

Los diferentes BACs se obtuvieron mediante recombinación homóloga en *E. coli* DH10B, utilizando el sistema de recombinación GET, mediante el plásmido pGETrec, (Narayanan et al., 1999, Orford et al., 2000) (**Figura 53, panel A**) sobre el BAC con el genoma completo de PRV: pBecker2 (Smith & Enquist, 1999)(**Figura 53, panel B**).

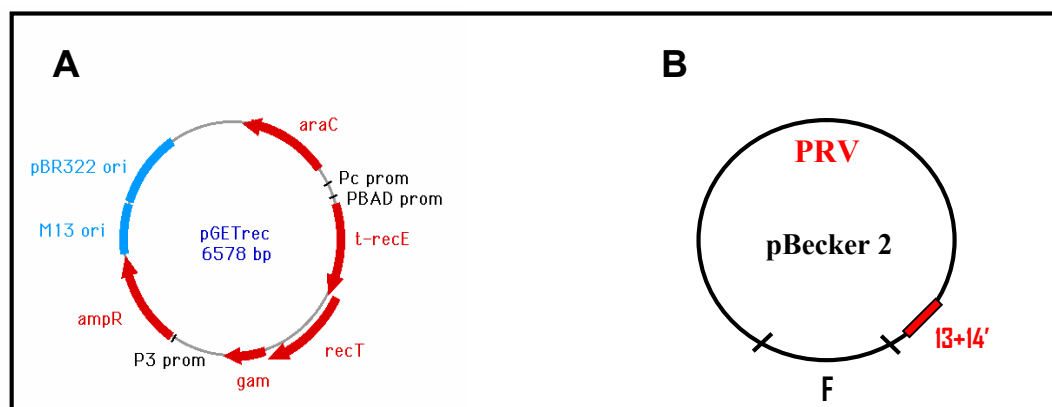


Figura 53. Esquemas. Panel A Mapa del plásmido pGETrec. En w.w.w.mcri.edu.au/downloads/cell_gene_therapy/pgetrec.gif; **Panel B.** Esquema representativo del pBecker2.

Los BACs obtenidos mediante esta técnica son deficientes en la proteína inmediatamente temprana 180 (IE180) y/o en las secuencias de empaquetamiento (*pac1* y *pac2*). A continuación se detalla la estrategia de obtención y la caracterización de cada BAC, en la **Figura 64** se esquematiza el genoma de los diferentes BACs obtenidos dentro de este estudio.

4.3.1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES BACs

4.3.1.1. BAC 18

El BAC 18 es deficiente en la región *pac1-pac2* directa (fragmentos *BamHI* 13 y 14'). Fue originado por recombinación homóloga entre el plásmido pCLS-kam y el pBecker2. El plásmido pCLS contiene los fragmentos *BamHI* 13 y 14' del genoma viral, obtenidos a partir del pBecker2, en estos fragmentos están incluidas las secuencias de empaquetamiento *pac1-pac2* (Prieto et al., 2002), el plásmido pCLS-kam fue generado por inserción del gen de la Kanamicina, proveniente del plásmido pUC4K, en lugar de la región *pac1-pac2D* (*pac1-pac2* directa) (*BamHI* 13-14'). Tanto el BAC 18 como el plásmido pCLS-kam han sido obtenidos y caracterizados dentro de otros estudios de nuestro laboratorio (datos no publicados).

4.3.1.2. BAC 51

El BAC 51 es deficiente en las regiones *pac1 - pac2* directa y *pac2* invertida, fue originado por recombinación homóloga, usando el sistema GET de recombinación (plásmido pGETrec) (Narayanan et al., 1999, Orford et al., 2000) en *E. coli* cepa DH10B, sobre el pBecker2 con el plásmido pCLR-K. Este plásmido se obtuvo al digerir el plásmido pCLS-R (Prieto et al., 2002) con la enzima de restricción *NaeI*, con el fin de eliminar el fragmento de 3824nt correspondiente a las regiones *pac1* y *pac2* tanto directa como invertida; en su lugar se insertó el gen de la Kanamicina obtenido de digerir el plásmido pUC4K con la enzima *EcoRI*, en la **Figura 54** se observa la estrategia de obtención del plásmido pCLR-K.

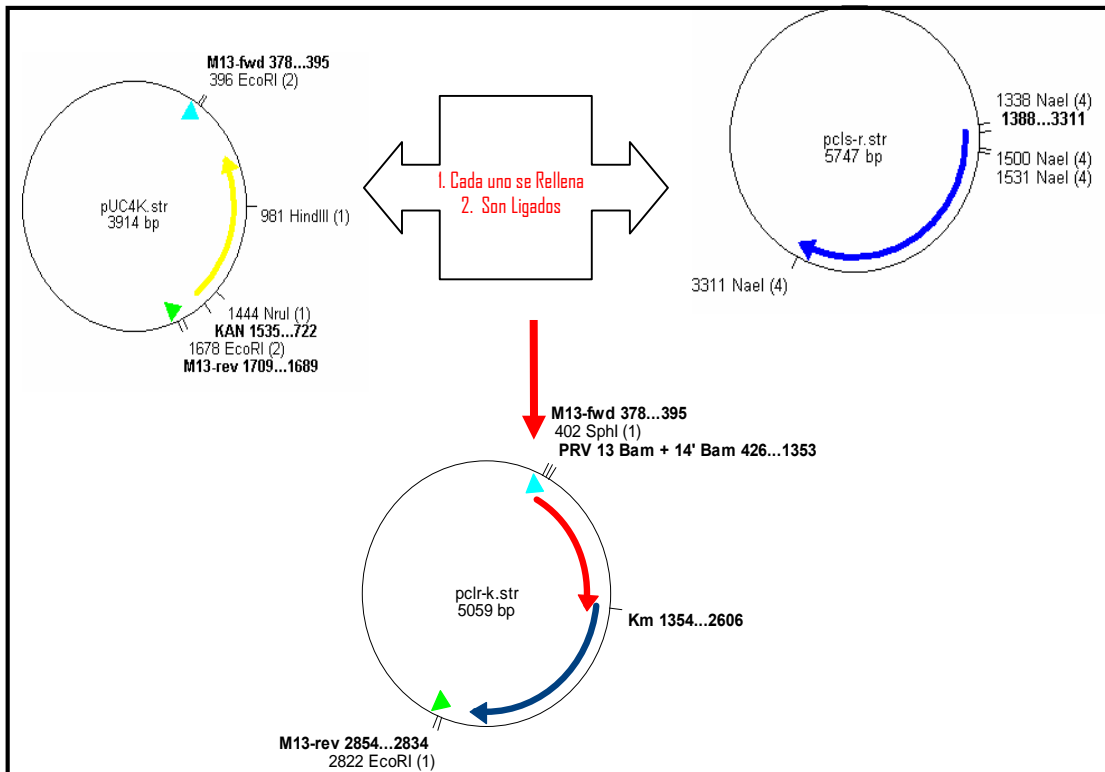


Figura 54. Estrategia de obtención del plásmido pCLR-K.

Una vez caracterizado, el plásmido pCLR-K fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SphI* originando 2 fragmentos: uno de 2639nt (correspondiente al pUC18) y otro de 2420nt (correspondiente a las zonas de recombinación y al gen de la kanamicina)(**Figura 54**), con este último fragmento se realizó la recombinación homóloga con el pBecker2, obteniendo de esta forma dos BACs denominados BAC 51 y BAC 52, que se caracterizaron por “Southern blot”, previa digestión de los DNAs con la enzima de restricción *BamHI* (**Figura 55, panel A**), para ser hibridados con la sonda *pac2* (región de 294pb donde están incluidas las secuencias *pac2* tanto directa como invertida) (**Figura 55, panel B**) y además los DNAs se hibridaron con la sonda kanamicina (región codificante del gen de la kanamicina de 463nt comprendida entre los nucleótidos 981 y 1444 del plásmido pUC4K).

Por medio de este “Southern blot” se evidenció que los BACs 51 y 52 habían incorporado el gen de la kanamicina (**Figura 55, panel C líneas M, N,**

O, P) y además que no tenían el gen correspondiente a las secuencias *pac2* directa ni invertida. (Figura 55, panel B líneas M, N, O, P).

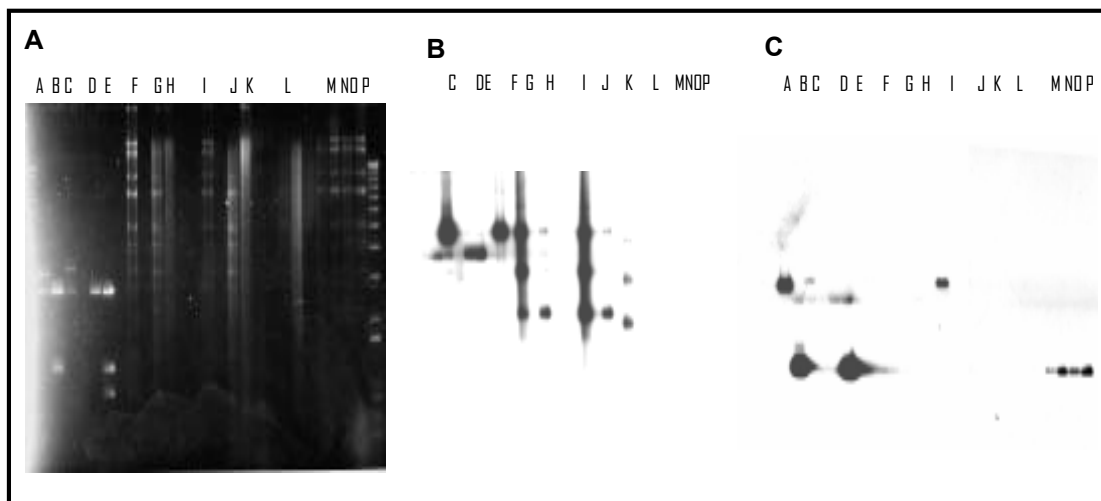


Figura 55. Caracterización de los BAC 51 y 52: Panel A. Electroforesis de DNAs de BACs digeridos. Gel al 0,75% antes de ser transferido a membrana de nylon. B. “Southern blot” frente a la región *pac2*. Los DNAs fueron digeridos con *Bam*HI pCLS-K (carril A); pUC4K (carril B); pCLS-R (carril C); pUC18 (carril D); pCLR-K (carril E); pBecker2 (carril F); VBecker2 núcleos(n) (carril G); VBecker2 (carril H); Bac18 (carril I); VBac18 (n) (carril J); VBAC18 (carril K); NIA-3 (carril L); BAC51 (carriles M y N); BAC52 (carriles O y P). C. “Southern blot” frente a la sonda kanamicina.

4.3.1.3. BAC 60

Este BAC es deficiente en las regiones *pac1* (fragmento *Bam*HI 13), *pac2* directa e invertida (fragmento *Bam*HI 14') y una copia de IE180 (región TR, fragmento *Bam*HI 8). Fue obtenido por recombinación homóloga específica entre el pBecker2 y el plásmido pOKC (descrito subsiguientemente).

Para realizar el plásmido pOKC fueron necesarios dos plásmidos intermedios el pOK y el pKC. La estrategia seguida para la obtención de este plásmido fue:

1. el plásmido pCLS-R fue digerido con las enzimas de restricción *Nru*I y *Xba*I, relleno y religado para así eliminar la región *pac1-pac2*, se

transformaron *E. coli* DH5 α , se aisló el DNA de 14 colonias que posteriormente se analizaron por digestión con la enzima *Bam*HI, donde según la construcción esperada debía linearizar en 3,1Kpb. Todas las colonias estaban bien, por lo tanto se escogió una al azar y se denominó pCRN (**Figura 56**).

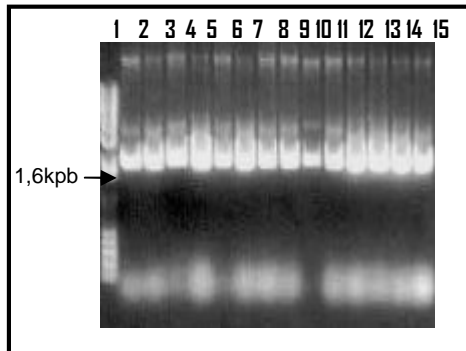


Figura 56. Caracterización del plásmido pCRN. Marcador de tamaños (Carril 1); colonias digeridas con *Bam*HI (carriles 2 al 15).

2. El plásmido pCRN fue linearizado con la enzima de restricción *Sall*, paralelamente el plásmido pUC4K también fue digerido con la enzima de restricción *Sall*, generando dos fragmentos uno de 2662nt, correspondiente al vector y otro de 1252nt correspondiente al gen de la kanamicina. El pCRN linearizado con *Sall* y el fragmento *Sall* de 1252nt proveniente del pUC4K fueron ligados, para así obtener el plásmido pCK. Las colonias fueron caracterizadas por digestión con la enzima de restricción *Eco*RI que según la construcción esperada podría estar en la orientación directa, originando dos fragmentos de 1,3 y 2,9kpb; o en la orientación invertida originando dos fragmentos de 0,6 y 3,6kpb. Se seleccionó la colonia 7 por estar en la orientación correcta y se denominó pKC (**Figura 57**).

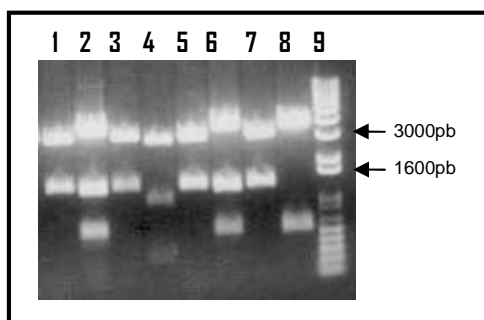


Figura 57. Caracterización plásmido pKC. Colonias digeridas con *EcoRI* (Carriles 1 al 8), marcador de tamaños (carril 9).

3. El plásmido pORI-S (fragmento *BamHI*5 de PRV clonado en el pUC18 entre las dianas *BamHI-SacI*) (Prieto et al., 2002), fue linearizado con *EcoRI*, paralelamente el plásmido pUC4K fue digerido con *EcoRI* originando dos fragmentos, uno de 2632nt correspondiente al vector y otro de 1282nt correspondiente al gen de la kanamicina. Fueron ligados el pORIs linearizado con *EcoRI* y el fragmento *EcoRI* de 1282pb proveniente del pUC4K, a continuación se electroporaron *E. coli* DH5 α , se extrajo el DNA a 15 colonias, se analizaron por digestión con las enzimas de restricción *NruI* y *NotI* y según la construcción esperada podría estar en la orientación directa originando dos fragmentos de 0,6 y 5,3kpb; o en la orientación invertida originando dos fragmentos de 1,4 y 4,5kpb. Se seleccionó la colonia 1 por estar en la orientación adecuada y se denominó pOK (**Figura 58**).

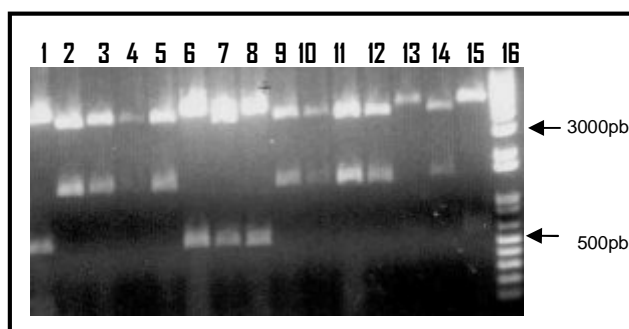


Figura 58. Caracterización del plásmido pOK. Colonias digeridas con *NruI*-*NotI* (carriles 1 al 15); marcador de tamaños (carril 16).

4. El plásmido pKC fue digerido con las enzimas *NruI* y *NdeI* generando dos fragmentos, uno de 453nt y otro de 3745nt, de los cuales el fragmento de 3745nt (correspondiente a las regiones de recombinación homóloga en la región *pac1* – *pac2* y al gen de la kanamicina) fue

purificado y ligado con el fragmento de 2432nt, obtenido de digerir el plásmido pOK con las enzimas de restricción *NruI* y *NdeI*, (fragmento que corresponde a la región de recombinación homóloga en la región del OriS y al gen de la Kanamicina). Se transformaron células DH5 α , se seleccionaron colonias por su resistencia a la Kanamicina y se analizaron 10 de ellas por medio de digestión con las enzimas de restricción *NcoI* y *NotI*, que según la construcción esperada debía originar dos fragmentos uno de 4,4kpb y otro de 1,7 kpb. Todas las colonias obtenidas estaban bien, por lo tanto se seleccionó una colonia al azar y se denominó pOKC (**Figura 59**).

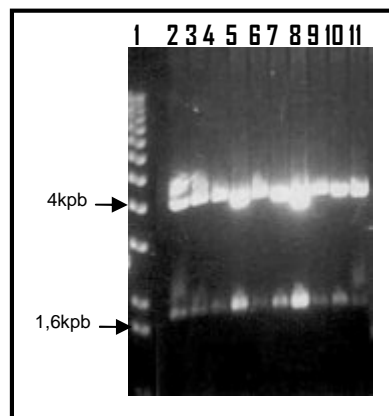


Figura 59. Caracterización del plásmido pOKC. Marcador de tamaños (carril 1); Colonias digeridas con *NcoI* y *NotI* (carriles 2 al 11).

Finalmente el plásmido pOKC se digirió con la enzima de restricción *PvuII* originando dos fragmentos de 2364 y 3813nt, con este último correspondiente a las zonas de recombinación en la región *pac1* - *pac2* y en el OriS más el gen de la kanamicina se transformaron células competentes *E. coli* DH10B-pGETrec-pBecker2, se seleccionaron colonias por su crecimiento en LB-cloramfenicol y kanamicina, se analizaron 10 colonias, teniendo tan solo una positiva, que se denominó BAC 60 y se caracterizó por “Southern blot” previa digestión de los DNAs del pBecker2, BAC 18, BAC 51 y BAC 60 con las enzimas de restricción *BamHI*, *Sall*, *NheI*, *NsiI* y *ScaI*, (**Figura 60, panel A**) para ser hibridados con la sonda IE180 (fragmento de 1,8kpb correspondiente a la región aminoterminal de la proteína IE180, contenida en el fragmento *BamHI* 8 de PRV (Yamada & Shimizu, 1994)).

Por medio de este “Southern blot” se evidenció que el BAC 60 sólo tenía la copia IR del gen IE180 (**Figura 60, panel B, líneas H, L, P, T**) a diferencia del pBecker 2 que tiene las dos copias (IR y TR) del gen IE180 (**Figura 60, panel B, líneas I, M, Q**).

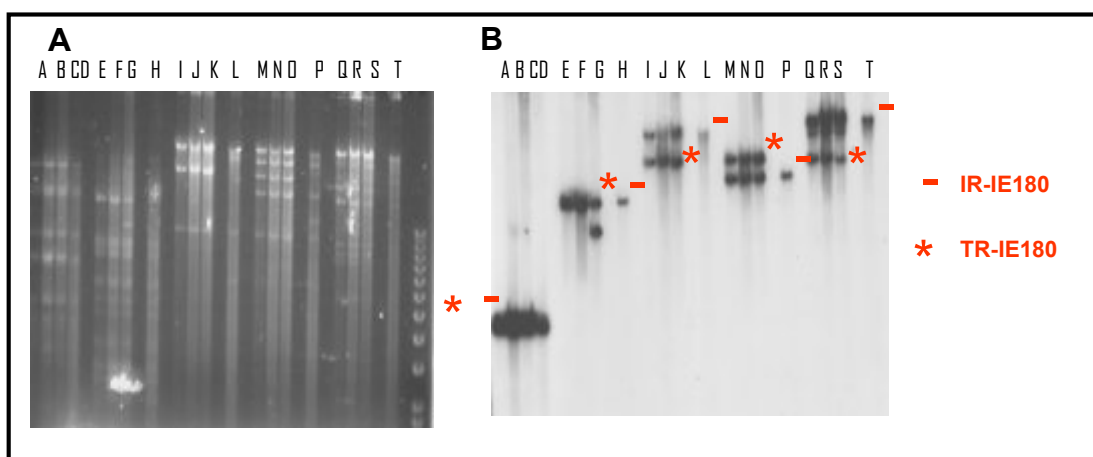


Figura 60. Caracterización del BAC 60. Panel A. Electroforesis de DNAs de los BACs digeridos. Gel al 0,75% antes de ser transferido a membrana de nylon. **Panel B.** “Southern blot” frente a la IE180. Los BACs fueron digeridos con *Bam*HI. pBecker2 (carril A); BAC 18 (carril B); BAC 51 (carril C); BAC 60 (carril D). Digeridos con *Sal*I. pBecker2 (carril E); BAC 18 (carril F); BAC 51 (carril G); BAC 60 (carril H). Digeridos con *Nhe*I. pBecker2 (carril I); BAC 18 (carril J); BAC 51 (carril K); BAC 60 (carril L). Digeridos con *Nsi*I. pBecker2 (carril M); BAC 18 (carril N); BAC 51 (carril O); BAC 60 (carril P). Digeridos con *Sca*I. pBecker2 (carril Q); BAC 18 (carril R); BAC 51 (carril S); BAC 60 (carril T).

4.3.1.4 BAC 70

Este BAC no tiene ninguna de las secuencias de empaquetamiento (*pac1*, *pac2* D e INV) ni ninguna de las dos copias del gen IE180. Se construyó por recombinación homóloga entre el plásmido p8TCO y el BAC 60 por medio del sistema GET recombinación (Narayanan et al., 1999, Orford et al., 2000) en células *E. coli* DH10B.

Para obtener el plásmido p8TCO fueron necesarios varios plásmidos intermedios.

1. Se obtuvo el plásmido pTCO que tiene el OriS de replicación de PRV junto con el gen de la tetraciclina al digerir el plásmido

pUTCA con las enzimas de restricción *EcoRI* relleno y *PstI*, a su vez el plásmido pUTCA se construyó al clonar la zona codificante del gen de la tetraciclina (región *EcoRI-AvaI* del plásmido pBR322) (Bolivar et al., 1977, Watson, 1988) en el vector pUC18. La digestión del plásmido pUTCA con las enzimas de restricción *EcoRI* relleno y *PstI* originó dos fragmentos de 2646nt (correspondiente al pUC18) y otro de 1450 (correspondiente al gen de la tetraciclina) que fue clonado con el fragmento de 2,3kpb obtenido de digerir el plásmido pRA17Sa con las enzimas de restricción *HpaI-PstI* (el plasmido pRA17Sa contiene el fragmento *BamHI* 5, fragmento que a su vez contiene el OriS,) originando así el plásmido pTCO (**Figura 61**).

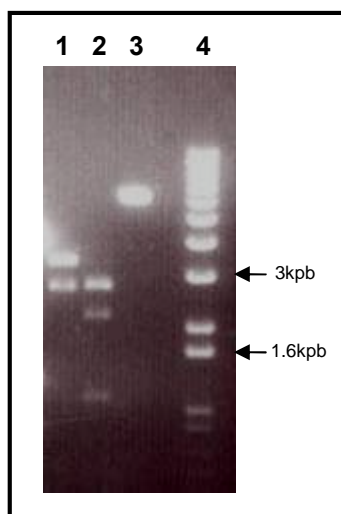


Figura 61. Caracterización del plásmido pTCO

1. digestión con *EcoRI* – *PstI*; origina fragmentos de 3462 – 2647pb
2. digestión con *BamHI* – *PstI*; origina fragmentos de 19 – 1055 – 2368 – 2667pb
3. digestión con *PstI*; lineariza 6109pb
4. Marcador de Tamaño.

2. Posteriormente se obtuvo el plásmido p8TC que contiene el fragmento 8' de *BamHI* y el gen de la tetraciclina. Para su realización se partió del plásmido pRBe7 (fragmento *BamHI* 8' del genoma del PRV clonado en el vector pUC18) y del plásmido pUTCA (región codificante de la tetraciclina en el vector pUC18).

Se digirió el plásmido pRBe7 con las enzimas de restricción *StuI* y *EcoRI* para obtener dos fragmentos: uno de 2217nt (correspondiente al fragmento *BamHI* 8') y otro de 5556nt que

se purificó y que en el plásmido final serviría de zona de recombinación homóloga en la región IE180-IR, este fragmento de 5,5kb se ligó con el fragmento de 1438pb, correspondiente al gen de la tetraciclina, obtenido de digerir el pUTCA, con *EcoRI* y *XbaI* relleno; para obtener así el plásmido p8TC que se caracterizó mediante digestión por endonucleasas de restricción (**Figura 62, panel A**).

3. Finalmente los plásmidos p8TC y pTCO fueron digeridos con *NheI* y *NdeI*, originando fragmentos de 4325 - 2351nt y de 1448 – 4693nt, respectivamente, de los cuales se usaron para el clonaje del plásmido p8TCO: el fragmento de 4325nt proveniente del plásmido p8TC digerido con *NheI*-*NdeI* y el fragmento de 4693nt proveniente del plásmido pTCO digerido igualmente con las mismas enzimas de restricción. El plásmido p8TCO se caracterizó por medio de digestión con enzimas de restricción (**Figura 62, panel A**) su mapa de restricción se puede observar en la **Figura 62 panel B**.

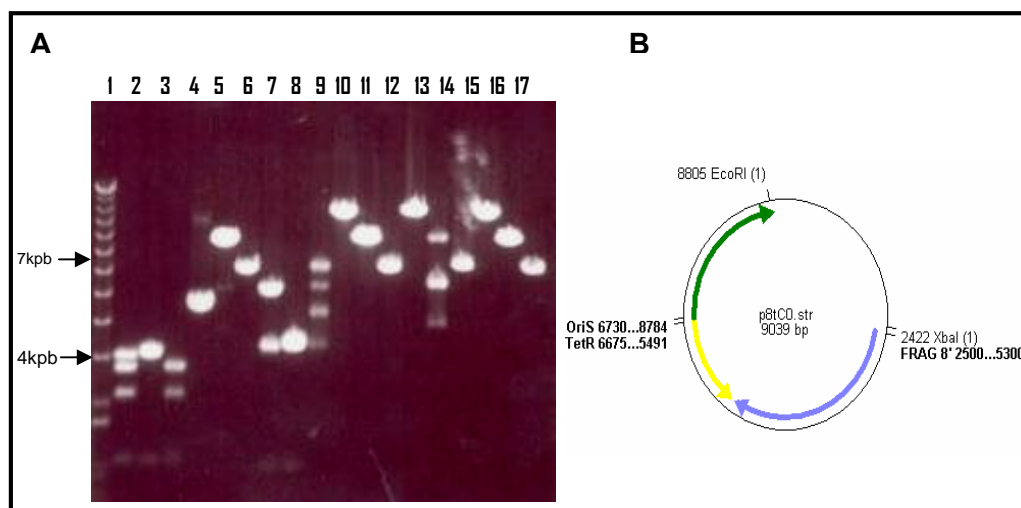


Figura 62. Panel A. Caracterización de los plásmidos pTCO, p8TC y p8TCO por digestión con enzimas de restricción. Marcador de Tamaño (carril 1); p8TCO + *BamHI* fragmentos de 2,9 – 1 – 2,7 – 2,4 Kpb (carril 2); p8TC+ *BamHI* fragmentos de 3 – 2,9 – 1 Kpb (carril 3); pTCO + *BamHI* fragmentos de 2,7 – 1 – 2,4 Kpb (carril 4); p8TCO + *KpnI* fragmentos de 4,6 – 4,3 – 0,024 Kpb (carril 5); p8TC + *KpnI* fragmentos de 6,7 Kpb (carril 6); pTCO + *KpnI* fragmentos de 6,1 Kpb (carril 7); p8TCO + *SphI* fragmentos de 5,2 – 3 – 0,773 Kpb (carril 8); p8TC + *SphI* fragmentos de 3,2 – 3 – 0,8 Kpb (carril 9); pTCO + *SphI* fragmentos de 5,2 – 0,9 Kb (carril 10); p8TCO + *EcoRI* lineariza en 9 Kpb (carril 11); p8TC+ *EcoRI* lineariza en 7 Kpb (carril 12); pTCO+ *EcoRI* lineariza en 6,1 Kpb (carril 13); p8TCO + *NdeI* lineariza en 9 Kpb 1(carril 14); p8TC+ *NdeI* lineariza en 7 Kpb (carril 15); pTCO + *NdeI* lineariza en 6,1 Kpb (carril 16); p8TCO + *NheI* lineariza en 9 Kpb (carril 17); p8TC+ *NheI* lineariza en 7 Kpb (carril 18); pTCO+ *NheI* lineariza en 6,1 Kpb (carril 19). **Panel B. Mapa de restricción del plásmido p8TCO.**

Una vez caracterizado el plásmido p8TCO, se inició el proceso de recombinación homóloga, primero se digirió el plásmido p8TCO con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* originando dos fragmentos, uno de 2656nt (correspondiente al pUC18) y otro de 6383nt correspondiente a las zonas de recombinación homóloga del OriS y del fragmento 8' de *BamHI*, además del gen de la tetraciclina. Con este fragmento se transformaron *E. coli* DH10B-pGETrec-BAC 60 competentes, se seleccionaron colonias por su crecimiento en LB-kanamicina-tetraciclina. Se analizaron 8 colonias, teniendo sólo una positiva, que se denominó BAC 70 y se caracterizó por "Southern blot" previa digestión de los DNAs del pBecker2, BAC 51, BAC 60 y BAC 70 con las enzimas de restricción *BamHI*, *NheI*, *NsiI* y *ScaI* (**Figura 63, panel A**), para ser hibridados con la sonda IE180 (fragmento de 1,8kpb correspondiente a la región aminoterminal de la proteína IE180, contenida en el fragmento *BamHI* 8 de PRV (Yamada & Shimizu, 1994)). Además los DNAs se hibridaron con la sonda *pac1* - *pac2*, correspondiente a los nucleótidos del 969 al 1726 del fragmento *BamHI* 13+14' del genoma de PRV (Klupp et al., 2004) .

Por medio de "Southern blot" se evidenció que el BAC 70 no tiene ninguna de las dos copias del gen IE180 (**Figura 63, panel B líneas D, H, L, P**) a diferencia del pBecker2 que tiene las dos copias del gen IE 180 (**Figura 63, panel B líneas A, E, I, M**) o del BAC 51 que sólo tiene la copia IR del gen IE180 (**Figura 63, panel B líneas C, G, K, O**). También por "Southern blot" se

evidenció que el BAC 70 no tiene ninguna de las dos secuencias de empaquetamiento (*pac1* y *pac2*) (Figura 63, panel C líneas D, H, L, P) a diferencia del pBecker2 que tiene los genes correspondientes a las dos secuencias de empaquetamiento (Figura 63, panel C líneas A, E, I, M).

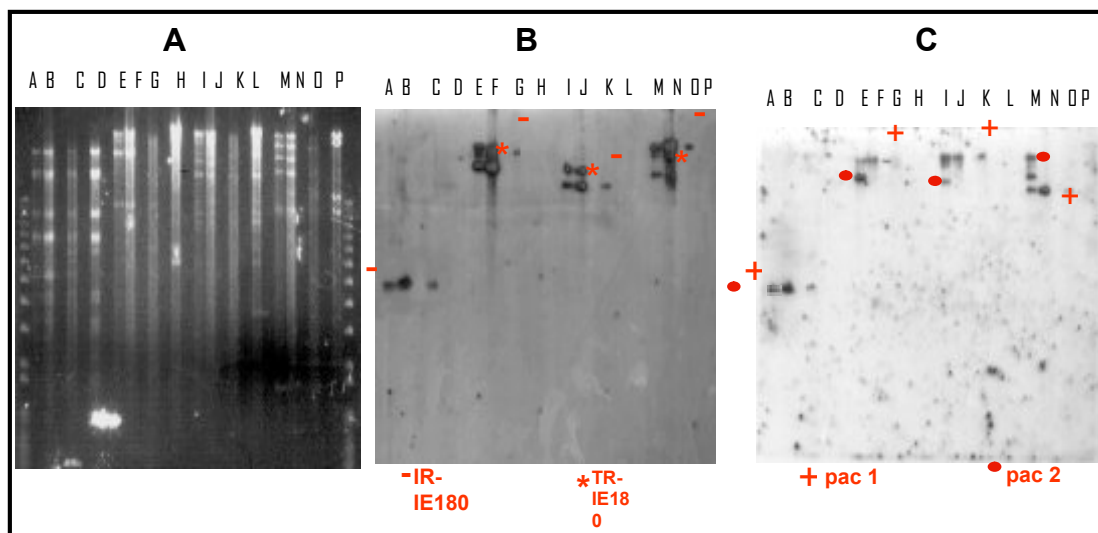


Figura 63. Caracterización del BAC 70. Panel A. Electroforesis de DNAs de BACs digeridos. Gel al 0,75% antes de ser transferido a membrana de nylon. Panel B. “Southern blot” frente a la región IE180 de PRV. Los DNAs fueron digeridos con *Bam*HI. pBecker2 (carril A); BAC 51 (carril B); BAC 60 (carril C); BAC 70 (carril D). Digeridos con *Nhe*I. pBecker2 (carril E); BAC 51 (carril F); BAC 60 (carril G); BAC 70 (carril H). Digeridos con *Sca*I. pBecker2 (carril I); BAC 51 (carril J); BAC 60 (carril K); BAC 70 (carril L). Digeridos con *Nsi*I pBecker2 (carril M); BAC 51 (carril N); BAC 60 (carril O); BAC 70 (carril P). Panel C. “Southern blot” frente la región *pac1-pac2* de PRV.

En la Figura 64 se esquematiza el genoma de los diferentes BACs de PRV, contruidos y caracterizados para llevar a cabo este estudio, basandose en el mapa físico de PRV generado al ser digerido con la enzima de restricción *Bam*HI.

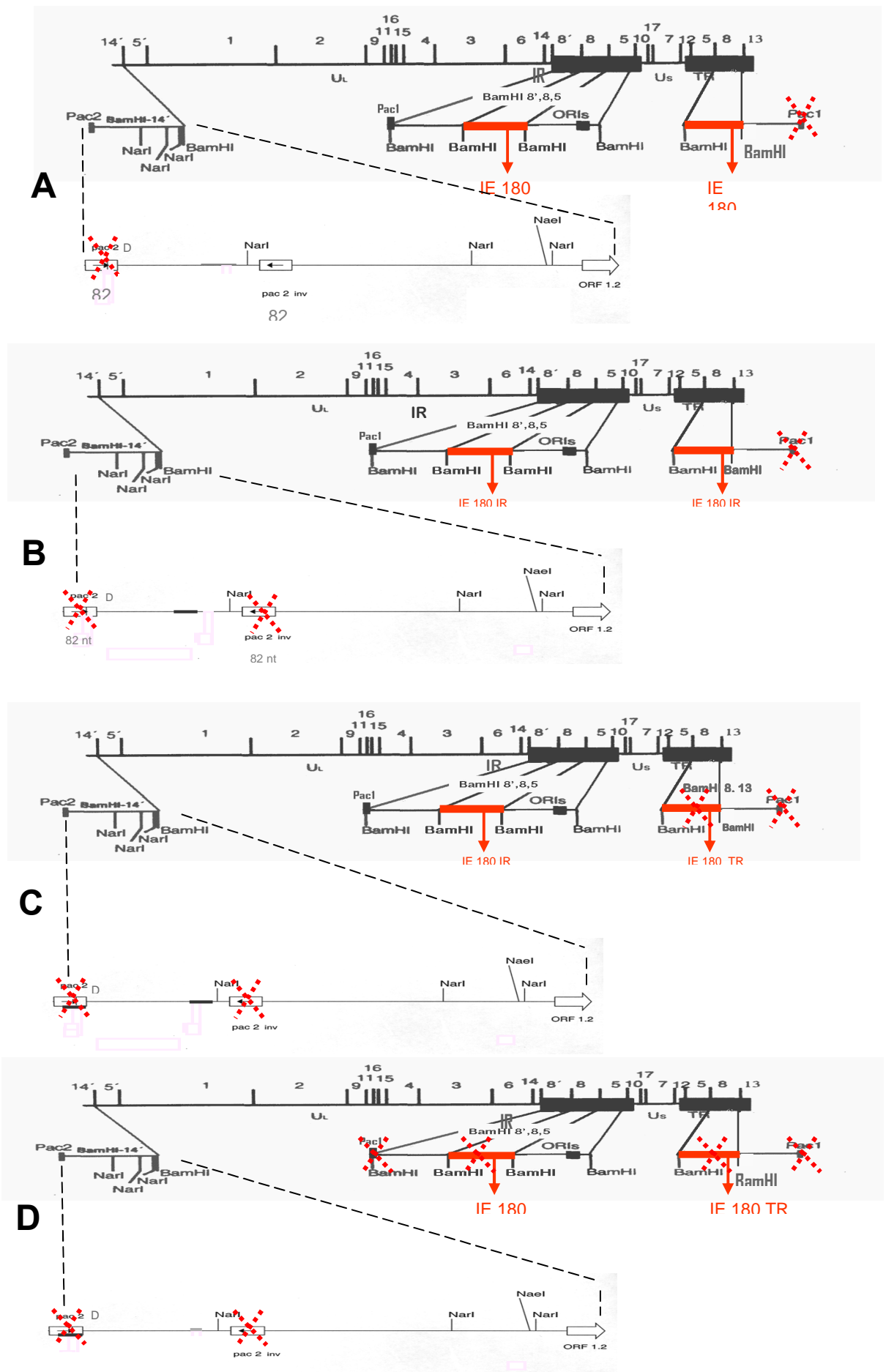


Figura 64. Diagramas esquemáticos del genoma de los BACs. Construidos sobre el mapa físico del genoma de PRV con la enzima *BamHI*, BAC 18 (A); BAC 51 (B); BAC 60 (C); BAC 70 (D).

4.3.2. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS *pac*

Al transfectar células Vero, por el método de lipofectamina (apartado 3.2.2.2) tan solo con los BACs (**Figura 65, panel A**) se observó que el BAC18 no produce virus, es decir la delección de la región *pac 1* IR- *pac2* directa bastó para que el BAC no tuviera capacidad de empaquetarse, por lo tanto la presencia de la zona *pac2* invertida no es suficiente para desencadenar el proceso de empaquetamiento. Por consiguiente al transfectar células Vero con los BACs 51 (además con delección de la región *pac2* inv) y BAC 70 (además deleccionado en la región *pac1* TR) tampoco se observó producción de virus, diferencia notable, en comparación con el BAC de PRV (pBecker2), que no tiene ninguna delección, que presenta un título alrededor de 10^6 .

4.3.3 PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS BACs

Con el fin de estudiar los BACs como agentes cooperadores en la producción de amplicones libres de virus se estudiaron sus propiedades biológicas.

Un amplicón es un vector plasmídico útil para la liberación de genes con un tamaño considerable, para su empaquetamiento dentro de viriones infecciosos es requerida la presencia de un virus cooperador. En HSV-1 se ha desarrollado un sistema de amplicones libres de virus, donde el virus cooperador es un BAC que contiene el genoma completo de HSV-1 pero es defectivo en las secuencias de empaquetamiento y en una proteína inmediatamente temprana esencial, la ICP27 (Saeki et al., 2003).

Al cotransfectar células Vero con los BACs y el amplicón pORIPAC-GF (**Figura 65, panel B**) sí que hay producción de amplicones (evaluada por la producción de fluorescencia) pero al mismo nivel o a un nivel inferior que la producción de virus contaminante (evaluada por la producción de focos no

fluorescentes) debida probablemente a fenómenos de recombinación o regeneración entre las secuencias *pac* presentes en el amplicón y en el BAC. Este fenómeno se observó en la cotransfección del pORIPAC-GF con los BACs 18, 51 y 60, excepto con el BAC 70 ya que este BAC es deficiente en el gen que codifica para única proteína inmediatamente temprana de PRV (IE180) y para su replicación es necesario que las células expresen dicha proteína.

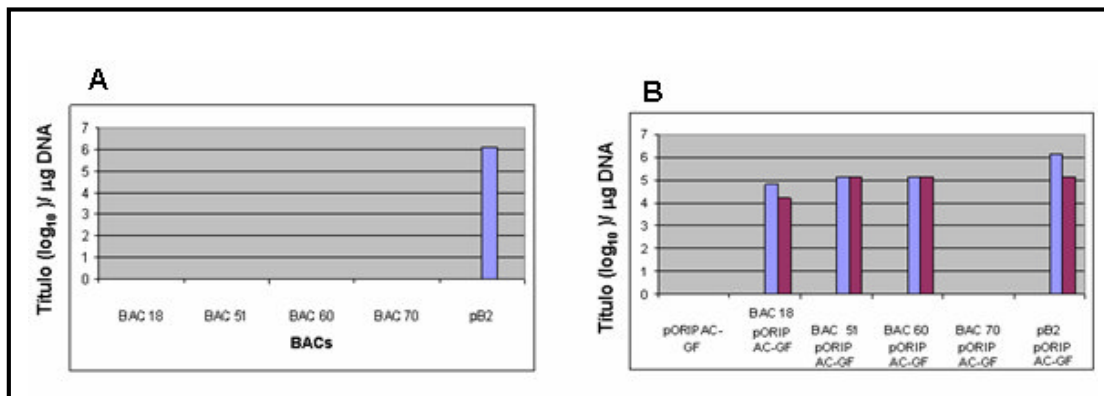


Figura 65. Producción de virus (■) o de amplicones (■) por medio de los BACs. **Panel A** Células Vero transfectadas con 2μg de DNA de los BACs 18, 51, 60, 70 y pBecker2. 48 horas después se lisaron las células y se determinó la producción de virus por titulación en células Vero. **Panel B.** Células Vero cotransfectadas con 1μg de DNA del pORIPAC-GF + 1μg de DNA del BAC 18; o + 1μg de DNA del BAC 51; o + 1μg de DNA del BAC 60; o + 1μg de DNA del BAC 70; o + 1μg de DNA del pBecker2. 48 horas después se lisaron las células y se determinó la producción de virus y amplicones por titulación en células Vero.

Para estudiar la producción tanto de virus como de amplicones del BAC 70, cuando éste es cotransfectado con el amplicón pORIPAC-GF, fue necesario hacer esta transfección en células Vero que expresen de forma transitoria la proteína IE180, para ello se cotransfectó con el plásmido pE180.

4.3.2.1. Obtención del plásmido pE180

Este plásmido se obtuvo al clonar el fragmento *BamHI-BamHI* del fragmento *BamHI-7* del genoma de PRV, en el sitio *BamHI* del "polylinker" del vector pCDNA3 (Invitrogen) (Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004)(**Figura 66, panel A**), la capacidad de expresión del plásmido pE180 se confirmó al

transfectar células 293T, por el método de precipitación de fosfato cálcico (Abad et al., 2002, Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) (**Figura 66, panel B**).

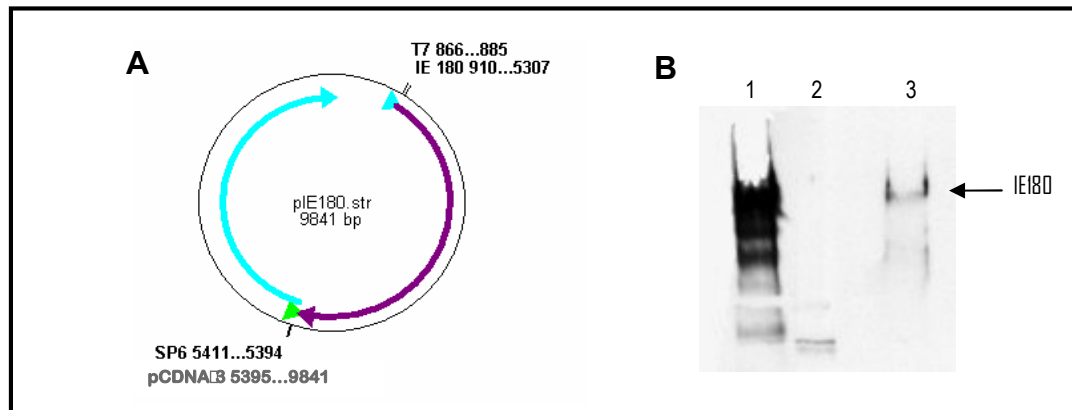


Figura 66. A. Mapa de restricción del plásmido pIE180; B. Expresión de la IE180 por el plásmido pIE180. Células 293T transfectadas con 5µg de DNA de 1. pIE180; 2. pEGFP-N1; 3. gIS8.

Al cotransfectar células Vero (por el método de Lipofectamina) con el BAC 70 y el plásmido pIE180 no existe proceso de recombinación y por lo tanto no hay producción de virus (**Figura 67, panel A fotos 2**); sin embargo cuando células Vero son cotransfectadas simultáneamente con el BAC 70, el amplicón pORIPAC-GF y el plásmido pIE180 (**Figura 67, panel A fotos 3**) se encontraron como datos significativos que sí que hay producción de amplicones, pero el título de estos amplicones tiene niveles muy similares al título de virus cooperador contaminante (**Figura 67, panel B**), esta producción de virus puede ser debida a recombinación entre secuencias en común del pORIPAC-GF y el pIE180, por ejemplo el promotor IE-CMV o secuencias comunes entre los plásmidos vectores (**Figura 67, panel A fotos 1**). El título de virus producido cuando es contranfectado el BAC 70 junto con el pORIPAC-GF y el pIE180, es 2 logaritmos menor que el título de virus producido cuando células Vero son transfectadas con el pBecker2 o contranfectadas con el pBecker2 y el pORIPAC-GF (**Figura 67, panel B**) lo que significa que el sistema además de presentar contaminación del virus cooperador produce una cantidad de amplicones limitada.

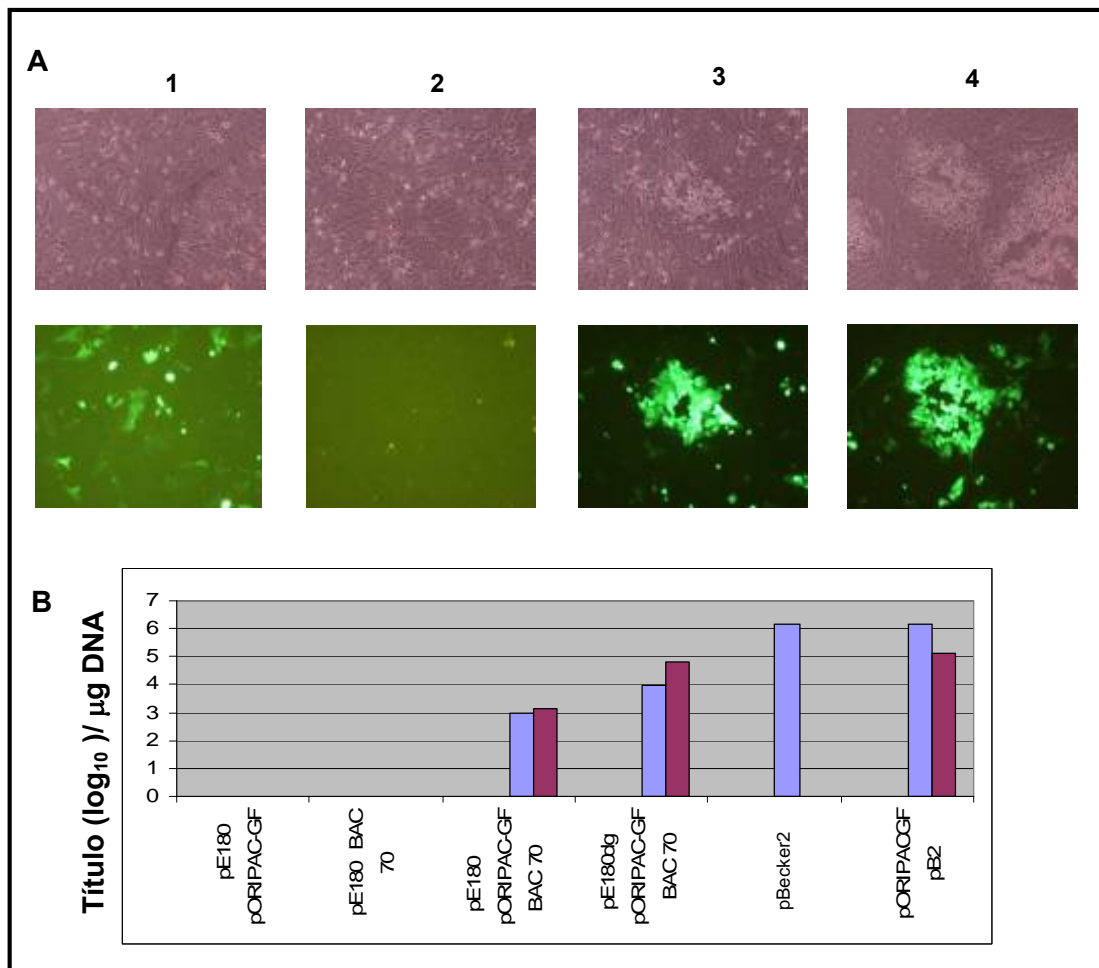


Figura 67. Producción de amplicones por el BAC 70. Panel A. Células Vero transfectadas con 1 μg de DNA de. pE180+pORIPAC-GF (foto 1); pE180+BAC 70 (foto 2); pE180+pORIPAC-GF+BAC 70 (foto 3); pBecker2+ pORIPAC-GF (foto 4). 96 horas después se lisaron las células y se determinó la producción de virus y amplicones por titulación en células Vero. **Panel B.** Producción de virus (■) o de amplicones (■) por medio del BAC 70.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. PRV COMO VECTOR VACUNAL

Las vacunas basadas en virus recombinantes representan una herramienta útil en el desarrollo de vacunas, PRV ha sido empleado satisfactoriamente como vector vacunal en diferentes enfermedades del cerdo (Hong et al., 2007, Hooft van Iddekinge et al., 1996, Jiang et al., 2007, Ju et al., 2005, Yin et al., 2007) y como vector de expresión de proteínas foráneas (Irnaten et al., 2001, Jons & Mettenleiter, 1997, Kerman et al., 2006, Kovacs & Mettenleiter, 1991, Prieto et al., 2002, Smith et al., 2000). Para la expresión de algunas de estas proteínas ha sido empleado el promotor gG (Jons & Mettenleiter, 1997, Kovacs & Mettenleiter, 1991, Mettenleiter & Rauh, 1990, Thomsen et al., 1987a, Xu et al., 2004) motivo por el cual hemos decidido analizar y caracterizar la expresión de éste promotor, usando la EGFP como proteína marcadora.

Por medio de este estudio se evidencia que el promotor gG puede ser empleado para la expresión de proteínas foráneas, sin la interferencia de su propio gen gG en virus recombinantes de PRV, al incorporar el “cassette” de expresión en el gen gE del genoma del virus gIS8. En el desarrollo de diferentes estrategias de vectores vacunales podría emplearse el sistema que se ha puesto a punto en el laboratorio que consiste en la construcción del plásmido con la proteína de interés, construcción de amplicón para la comprobación de su expresión y finalmente obtención virus recombinantes expresando dicha proteína. Para ello hemos construido el plásmido pSD4-AG (apartado 4.1.1.3) que tiene dos dianas únicas, *NcoI* – *NotI*, donde podría insertarse la zona codificante de la proteína de interés bajo el control del promotor gG de PRV y pueda ser empleado para el desarrollo de virus recombinantes o para el paso al amplicón pORIPAC (Prieto et al., 2002) ya

que el plásmido cuenta con dos dianas *EcoRI* flanqueando el “cassette” de expresión y en el pORIPAC es diana única.

El virus recombinante gIS8 y sus derivados (D3, S3, R10), son deficientes para la TK, gl, gE y 11K. La deficiencia en gE los convierte en cepas víricas atenuadas marcadas, que podrían ser empleadas como vectores vacunales para el control de la enfermedad de Aujeszky o para el control de otras enfermedades, al poderse emplear el PRV como vector polivalente (Hong et al., 2007, Jiang et al., 2007, Xu et al., 2004), esta deficiencia permite diferenciar por métodos serológicos los cerdos infectados de los cerdos vacunados.

Las imágenes moleculares se han convertido en una tecnología importante no invasiva para evaluar y controlar enfermedades específicas o procesos biológicos *in vivo*. Se han empleado mutantes de PRV expresando la EGFP no solo para el estudio de la replicación vírica en cultivos celulares si no como herramienta para la investigación neurobiológica en animales (Billig et al., 2007, Chien et al., 1998, Smith et al., 2000). Se han empleado como neurotrazadores virus recombinantes derivados de la cepa Bartha, y por lo tanto cepas gE negativas (Billig et al., 2007, Kerman et al., 2006) aprovechando el neurotropismo de PRV y su capacidad de infectar neuronas en diferentes modelos animales y sobre todo su capacidad para esparcirse sólo en dirección retrograda simplificando el análisis de los resultados (Aston-Jones & Card, 2000). Los virus recombinantes R10 y S3 (apartados 4.2.2.1.5 y 4.2.2.1.3, respectivamente) podrían también ser empleados como neurotrazadores ya que son cepas atenuadas al ser deficientes para la TK, gl y gE, además podrían junto con la EGFP coexpresar un gen de interés, cuya expresión podría ser indirectamente localizada y cuantificada por la evaluación del gen marcador.

PRV puede infectar y destruir tumores humanos y de ratones *in vivo* sin producir enfermedad (Boldogkoi et al., 2002), sugiriendo su potencial

uso como agente oncolítico para tumores humanos, en cuyo caso la delección de genes virulentos es importante como medida de seguridad. El virus recombinante XGF-G (apartado 4.2.2.1.6) procede del virus gIS8, por lo tanto es deficiente para la TK, gI, gE y posee la TK de HSV-1 bajo el control del promotor $\alpha 4$, que les confiere una mayor sensibilidad a los análogos de nucleósidos en comparación con la cepa salvaje de PRV, la cual expresa su propia TK pero con una sensibilidad menor a los análogos de nucleósidos, como el ganciclovir (GCV), (Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004). El virus recombinante gIS8 y sus derivados pueden ser empleados para el desarrollo de nuevos vectores vacunales y/o virus recombinantes, usando el GCV como marcador de selección. Así mismo son candidatos para su uso como agentes oncolíticos al tener una mayor sensibilidad al GCV, en comparación con la cepa salvaje, confiriéndole un factor de bioseguridad añadido si se diera el caso de una replicación en regiones por fuera del tumor. Asimismo no existiría el potencial obstáculo de la intervención perjudicial de la respuesta inmune frente a los vectores de PRV.

5.2 ACTIVIDAD IE DEL PROMOTOR gG

Inicialmente comparamos el promotor gG con un promotor ampliamente estudiado como es el promotor IE de CMV, confirmando de este modo que el promotor gG es un promotor fuerte (Kovacs & Mettenleiter, 1991, Thomsen et al., 1987a) y que sus niveles de expresión son similares a los niveles de expresión obtenidos por el IE de CMV (Muñoz et al., 2006).

La influencia del péptido señal fue crucial en la intensidad de la fluorescencia de la EGFP, ya que al clonar la EGFP justo después del péptido señal bajo el promotor gG en el plásmido pZRHEGFP (apartado 4.1.1.1), en el amplicón pOGFP (apartado 4.1.2.1) y en el virus recombinante D3 (4.2.2.1.1) la intensidad de la fluorescencia se veía

claramente disminuida al detectarse por microscopia de fluorescencia. Este problema fue solucionado al eliminar la secuencia correspondiente al péptido señal en estas construcciones, obteniendo así los plásmidos pZGF-SD y pZGF-SD4 (apartado 4.1.1.2) y los amplicones pOGF-SD y pOGF-SD4 (apartado 4.1.2.2). Es de aclarar que esta disminución en la intensidad de la fluorescencia no está relacionada con los niveles de expresión de la EGFP valorados por WB (Muñoz et al., 2006).

El promotor gG está definido como un promotor temprano (β) (Kovacs & Mettenleiter, 1991, Mettenleiter & Rauh, 1990, Thomsen et al., 1987a) pero en nuestras construcciones con la EGFP como proteína marcadora bajo el promotor gG y sin péptido señal detectamos también algo de actividad a niveles inmediatamente tempranos.

Al transfectar células Vero y 293T con los plásmidos pZGF-SD y pZGF-SD4 o con los amplicones pOGF-SD y pOGF-SD4, sin virus cooperador, observamos la presencia de algunas células fluorescentes (**Figuras 30 y 31**) lo que nos hizo pensar que la EGFP bajo el promotor gG podría presentar algo actividad inmediatamente temprana (α), para descartar interferencias del poli A de SV40 (presente en estas construcciones) en este fenómeno, se construyeron plásmidos en los cuales se cambió dicho poli A por el propio poli A de la gG, obteniendo el plásmido pSD4-AG y el amplicón pOSD4-AG, pero al transfectar células Vero y 293T con estas construcciones también se observaba la presencia algunas células fluorescentes (**Figura 30, foto 4; figura 31, panel A foto 3 y panel B foto 3**).

Para confirmar la hipótesis del comportamiento del promotor gG como α , analizamos la actividad de dicho promotor por medio de la expresión en los mRNAs de dos grupos de virus recombinantes diferentes: el primer grupo de virus recombinantes conformado por los virus: D3 (4.2.1.1), S3 (4.2.2.1.3) y R10 (4.2.2.1.5), caracterizados por expresar la EGFP bajo el

promotor gG, además de expresar su propia gG. El segundo grupo de virus recombinantes está conformado por los virus XGF-N y XGF- G (4.2.2.1.6), caracterizados por ser deficientes en la glicoproteína gG y por expresar la EGFP bajo el promotor gG. Al infectar con estos virus recombinantes células Vero en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas como la CHX para acumular los mRNAs α y posteriormente permitiendo su traducción en presencia de ActD se visualizan células fluorescentes (**Figura 42, línea B**) en todos los virus recombinantes, excepto en el D3 debido a la influencia del péptido señal en la expresión de la EGFP. También se detecta expresión de la EGFP a niveles α mediante WB, aunque el nivel de expresión de esta proteína es mayormente β (**Figura 44**). Por “Western blot” frente a la propia gG de PRV también se confirma que su expresión es mayormente β , pero existe algo de actividad α (**Figura 48**). Dada la baja expresión, el comportamiento del gen se podría definir como un pseudo gen α como ocurre con la expresión de la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa del virus HSV-2 (Hayward, 1993). La RR de HSV esta conformada por dos subunidades de proteínas heterólogas, la subunidad pequeña (RR2) que es regulada como β y requiere de la ICP4 para su expresión, a diferencia de la subunidad grande (RR1) que es regulada como α . En células infectadas con HSV-2, la RR es expresada como una proteína temprana, sin embargo el promotor de la subunidad grande de la ribonucleótido reductasa (RR1) en transfecciones transitorias se comporta como α (Jones et al., 1993) y en HSV-1 este mismo promotor ha sido definido como un no verdadero promotor inmediatamente temprano o pseudo gen α (Sze & Herman, 1992) (Hayward, 1993).

En HSV-1 y HSV-2 se han localizado, por análisis funcional, secuencias diana involucradas en la respuesta de los genes IE a TIF (“*trans*-inducing factor”). La secuencia consenso es TAATGARATTC (Campbell & Preston, 1987, Preston et al., 1984, Spector et al., 1991). En el promotor RR1 está incluida la secuencia consenso TAATGARATTC (Hanson et al., 1994, Smith et al., 1998), presente en todos los genes inmediatamente tempranos de HSV. Se ha descrito que al infectar células

de primate con HSV-2 se expresaron bajos niveles de los transcritos de la RR1 en presencia de cicloheximida, indicando que RR1 no es un verdadero gen α (Hanson et al., 1994).

En el gen IE de PRV existen motivos parecidos al TAATGARATTC que pueden mediar la respuesta a TIF ("*trans*-inducing factor") (Campbell & Preston, 1987). En PRV se ha descrito una secuencia consenso: GGCCAATGGGATTT (Campbell & Preston, 1987), homóloga a la secuencia consenso de HSV, que se encuentra reiteradamente incluida la secuencia del promotor IE180 de PRV (entre los nucleótidos 136590 al 137391 (Klupp et al., 2004)), además en los genes inmediatamente de los citomegalovirus murino y humano (MCMV y HCMV) se encuentran repeticiones de una secuencia consenso, también homóloga a la descrita en HSV.

En el promotor gG, entre los nucleótidos 22 y 33 de la caja TATA, se encuentra una secuencia similar: TGATGAGATAC, que tiene homología con la secuencia consenso encontrada en los genes α de los HSV. Se investigará en el futuro si esta secuencia está relacionada con la actividad IE del promotor gG.

5.3. EFECTO DE LA INFECCIÓN DE HSV SOBRE LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR gG de PRV

Al realizar coinfecciones entre el virus recombinante de PRV S3 (con la EGFP bajo el control del promotor gG, para diferenciar la infección) y los deficientes de HSV-1 G2, con delección completa de la ICP4, (Gómez-Sebastián & Tabarés, 2004) y d120, que tiene solamente el dominio de *trans*-activación de la ICP4, (DeLuca et al., 1984) en células E5, permisivas para los deficientes, (DeLuca et al., 1985) y en células Vero, no permisivas para los deficientes observamos que existía una inhibición de la replicación vírica del S3 a niveles tempranos ya que había ausencia de fluorescencia.

Al realizar las coinfecciones en células E5 a una M.O.I muy baja (0,01), cuando las infecciones no han confluido se observa algo de replicación de los dos virus (evaluada por la presencia de focos no fluorescentes y fluorescentes), pero cuando éstas confluyen ya no se observa fluorescencia, esto significa que el S3 se ha inhibido. Al coinfectar con el deficiente d120 la inhibición del PRV es mayor que cuando se realiza con el deficiente G2, indicando que el dominio de *trans*-activación de la ICP4 juega un papel importante en dicha inhibición (**Figura 50**). Si las células E5 son infectadas únicamente con el virus S3 éste presenta un título alrededor de 10^8 , al igual que los deficientes de HSV-1, sin embargo al realizar coinfecciones el título de los deficientes de HSV-1 no se ve alterado y el de PRV es disminuido y esta disminución está correlacionada con la M.O.I porque a mayor M.O.I mayor inhibición (**Figura 50**).

La interferencia en la replicación de PRV es debida a productos inmediatamente tempranos de HSV porque al realizar las coinfecciones en células Vero, no permisivas para los deficientes, también se observa inhibición (**Figuras 51 y 52**) en función de la M.O.I de PRV a una M.O.I de 2,0 la inhibición es menor que una M.O.I de 0,2 donde no hay producción de virus debido a la inhibición total de la replicación del PRV por la infección de HSV-1.

5.4 EFECTOS DE LA DELECCIÓN DE LAS SECUENCIAS *pac* EN EL EMPAQUETAMIENTO DE PRV

Con el fin de obtener amplicones libres de virus se han obtenido BACs cooperadores que han servido para el análisis funcional de las secuencias de empaquetamiento (*pac*).

Nuestros resultados confirman que las secuencias conservadas en los herpesvirus denominadas *pac1* y *pac2*, están implicadas en el proceso de

empaquetamiento del DNA, este análisis fue realizado usando BACs de PRV con genomas defectivos en dichas secuencias de empaquetamiento.

Para determinar la influencia de las secuencias *pac* en el proceso de empaquetamiento hemos construido BACs de PRV con diferentes deleciones en las secuencias de empaquetamiento (apartado 4.3.1). El BAC 18 es defectivo en *pac1* IR y *pac2* D, el BAC 51 es defectivo en *pac1* IR, *pac2* D y *pac2* inv y finalmente el BAC 70 es defectivo en *pac1* IR y TR, *pac2* D y *pac2* inv, además también es defectivo en las dos copias del gen que codifica para la IE180. En la **Figura 64** se esquematizan los diferentes BACs construidos, mostrando las regiones eliminadas.

La importancia de las secuencias *pac* se demostró por la deleción en la región *pac2* D efectuada sobre el BAC 18, ya que dicha deleción impide que se lleve a cabo el proceso de empaquetamiento y por consiguiente producción de virus, cuando se transfectan células Vero con este DNA. La secuencia *pac2* inv, aún presente en el genoma del BAC 18, no compensa la deficiencia de *pac2* D y no es suficiente para conseguir llevar a cabo el proceso de empaquetamiento. Por consiguiente al transfectar células Vero con el BAC 51 y el BAC 70 tampoco se produce empaquetamiento, en contraste sí se recupera virus al transfectar células Vero con el BAC con el genoma completo de PRV (pBecker2) (**Figura 65, panel A**).

Los HSV son ampliamente empleados en estrategias de terapia génica (Shah & Breakefield, 2006, Tyler et al., 2006, Winkeler et al., 2007), sin embargo el uso de vectores derivados de HSV para terapia génica en humanos tiene inconvenientes tales como la posibilidad de recombinación entre el vector de HSV y los virus latentes pre-existentes en el individuo tratado pudiendo conllevar a la formación de una nueva versión virulenta del virus, además de la presencia de inmunidad pre-existente en el individuo a tratar ya que la mayoría de la población ha tenido una infección por HSV (Oehmig et al., 2004a, Prieto et al., 2002).

Por esta razón PRV puede ser una herramienta alternativa para la transferencia de genes a células humanas, puesto que las puede infectar (Sawitzky, 1997) sin llegar a producir patología en los humanos (Enquist et al., 1998), además de las otras ventajas de PRV tales como su posible utilización en diferentes modelos animales (Tian et al., 2006, Weigel et al., 2003, Yin et al., 2007), su neurotropismo (Smith et al., 2000) y capacidad de producción de infecciones latentes (Osorio & Rock, 1992).

Se han descrito diferentes estrategias para obtener amplicones libres de virus de HSV-1, primero se describió un sistema basado en cósmidos, con el genoma de HSV-1 defectivo en secuencias *pac*, como virus cooperador que no genera genoma de HSV-1 que pueda ser empaquetado pero que sí proporciona las funciones requeridas para la replicación y el empaquetamiento del amplicón de DNA cotransfectado (Fraefel et al., 1996), pero los inconvenientes de este sistema fueron la inestabilidad del genoma de HSV-1 clonado en el cósmido y la presencia de, aunque poca, contaminación del virus cooperador. Subsiguientemente se clonó el genoma de HSV-1 en BACs y se desarrollaron sistemas de amplicones libres de virus basados en BACs defectivos en las secuencias de empaquetamiento (Saeki et al., 1998), pero también había contaminación del virus cooperador y en mayor grado que en el sistema basado en cósmidos. Finalmente se desarrolló un sistema de empaquetamiento donde las funciones del virus cooperador eran suplidas por dos plásmidos diferentes: un BAC deficiente en el gen que codifica para la ICP27 (proteína α , esencial) y sin secuencias de empaquetamiento, junto con un plásmido que expresa la ICP27, eliminado de este modo la contaminación del virus cooperador y con altos títulos de amplicón (Saeki et al., 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y las ventajas que tiene PRV sobre HSV-1, en nuestro laboratorio se ha estado tratando de desarrollar un sistema de amplicones de PRV libres de virus basado en los BACs desarrollados en este estudio. Se comprobó que no era suficiente con la

eliminación de algunas de las señales de empaquetamiento en los BACs de PRV para evitar la contaminación de virus cooperador en los “stock” de amplicones (**Figura 65**) igual que sucedió en el desarrollo de estrategias parecidas para conseguir amplicones de HSV-1 libres de virus (Saeki et al., 1998). En los “stocks” viricos obtenidos al cotransfectar el amplicón de PRV pORIPAC-GF (Prieto et al., 2002) junto con el BAC 18, BAC 51 O BAC 60 existía producción de amplicones pero además de virus cooperador contaminante (**Figura 65, panel B**), la recuperación constante de virus puede explicarse que surja por recombinación entre el amplicón y los diferentes virus cooperadores, ya que el amplicón por sí sólo no es capaz de auto-replicar (**Figura 65, panel B**).

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió cambiar de estrategia, basándose en los antecedentes positivos obtenidos al eliminar además el gen que codifica para una proteína α del BAC de HSV-1 y suplir su carencia por medio de la cotransfección con un segundo plásmido que la exprese (Saeki et al., 2003), construyendo el BAC 70 (apartado 4.3.1.4) defectivo en todas las secuencias de empaquetamiento y sin ninguna de las dos copias del gen que codifica para la única proteína α de PRV, la IE180, para suplir la carencia de ésta se cotransfectaba con el plásmido pIE180 (apartado 4.3.2.1), pero nuestros resultados no fueron satisfactorios, aunque había producción de amplicones, éstos estaban contaminados de virus cooperador (**Figura 67, panel B**), atribuyendo la recuperación de virus cooperador a posibles recombinaciones entre el plásmido pIE180, que expresa la IE180 bajo el control del promotor IECMV, el mismo promotor que en el amplicón PORIPAC-GF controla la expresión de la EGFP.

La deficiencia en IE180 del BAC 70 es confirmada por la ausencia de producción de virus en presencia de amplicones y si lo hace cuando se pone en presencia del plásmido que expresa la IE180. Esto indica que el BAC 70 podría ser usado como agente cooperador en la producción de amplicones libres de virus si la IE180 es suministrada por un plásmido que exprese dicha proteína bajo el control del propio promotor de la IE180 o por medio de una

línea celular que la exprese de manera estable, siendo éste un sistema más limpio y eficaz. Actualmente en nuestro laboratorio se está trabajando en el desarrollo de estas dos estrategias.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El promotor gG se ha definido previamente como un promotor fuerte y de regulación temprana, en nuestros estudios hemos comprobado que es un promotor fuerte, pero que en su expresión, aunque mayoritariamente es temprana, se encuentra algo de actividad inmediatamente temprana.
2. El promotor gG ha sido empleado para la expresión eficiente de una proteína foránea (EGFP) sin la interferencia de su propio gen gG, cuando el “cassette” de expresión se ha incorporado el gen gE del genoma del virus recombinante gIS8.
3. Se observa una disminución en la intensidad de la fluorescencia cuando la EGFP es clonada inmediatamente después del péptido señal de la gG y del péptido de fusión (11 aminoácidos) usados para que la proteína entre en fase tanto en plásmidos, amplicones y virus recombinantes.
4. Se ha obtenido y caracterizado el plásmido pSD4-AG que posee las dianas únicas *NcoI-NotI*, las cuales pueden ser usadas para la introducción de genes foráneos, bajo el control del promotor gG, que codifiquen para proteínas que tengan relevancia en el desarrollo de vacunas.
5. El plásmido pSD4-AG tiene dos dianas *EcoRI* que pueden ser empleadas para aislar el “cassette” de expresión y sucesivamente incorporarlo en el amplicón de PRV, pORIPAC-GF, y así poder

controlar el nivel de expresión de dicha proteína o bien para iniciar la obtención de virus recombinantes.

6. Se han obtenido y caracterizado los virus recombinantes: S3, R10 Y XGF-G que se pueden definir como virus atenuados al ser defectivos en los genes TK, gl y gE de PRV, pero que conservan la capacidad de invasividad, y que además expresan la EGFP bajo el control del promotor gG, por lo cual podrían ser utilizados como neurotrazadores y así poder controlar la replicación vírica y el esparcimiento sin destrucción de las células.
7. Los virus recombinantes obtenidos a partir del virus parental gIS8 (S3, R10 Y XGF-G) y el propio gIS8 pueden ser aprovechados como vectores vacunales y marcadores en el control de la enfermedad de Aujeszky, al ser defectivos en el gen gE.
8. Al coinfectar la cepa F o los deficientes en ICP4 (d120 o G2) de HSV-1 junto con el virus recombinante de PRV S3, se produce bloqueo en las fases tempranas del ciclo replicativo de PRV, evidenciado por la ausencia de expresión de la EGFP bajo el control del promotor gG, sin embargo la producción vírica de HSV-1 no se ve alterada. Indicando que estos virus pueden competir por factores celulares y que HSV-1 tiene mayor capacidad de adaptarse a los tipos celulares ensayados inhibiendo totalmente la replicación de PRV a bajas multiplicidades de infección.
9. Las regiones *pac1* IR y *pac2* D son esenciales para que el proceso de empaquetamiento en PRV pueda realizarse y dicho proceso no es llevado a cabo únicamente con las regiones *pac1* TR y *pac2* inv.
10. Existe recombinación entre el amplicón de PRV pORIPAC-GF y los virus cooperadores (BACs 18, 51 y 60) originando la presencia de virus

contaminante en proporciones aproximadas a la de los amplicones obtenidos.

11. Cuando son cotransfectados: el amplicón de PRV pORIPAC-GF, el BAC70 y el plásmido pIE180 (suple la función de la IE180 en *trans*) también se ocasiona producción de virus contaminante, además el título de amplicones empaquetados obtenido es muy bajo, por lo tanto el sistema debe perfeccionarse.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, J. L., Serrano, F., San Roman, A. L., Delgado, R., Bernad, A. & Gonzalez, M. A. (2002). Single-step, multiple retroviral transduction of human T cells. *J Gene Med* **4**, 27-37.
- Aston-Jones, G. & Card, J. P. (2000). Use of pseudorabies virus to delineate multisynaptic circuits in brain: opportunities and limitations. *J Neurosci Methods* **103**, 51-61.
- Bakkali, L., Guillou, R., Gonzague, M. & Cruciere, C. (1994). A rapid and sensitive chemiluminescence dot-immunobinding assay for screening hybridoma supernatants. *J Immunol Methods* **170**, 177-84.
- Ben-Porat, T. & Kaplan, A. S. (1976). A comparison of two populations of defective, interfering pseudorabies virus particles. *Virology* **72**, 471-9.
- Bennett, L. M., Timmins, J. G., Thomsen, D. R. & Post, L. E. (1986). The processing of pseudorabies virus glycoprotein gX in infected cells and in an uninfected cell line. *Virology* **155**, 707-15.
- Billig, I., Yeager, M. S., Blikas, A. & Raz, Y. (2007). Neurons in the cochlear nuclei controlling the tensor tympani muscle in the rat: a study using pseudorabies virus. *Brain Res* **1154**, 124-36.
- Boldogkoi, Z., Bratincsak, A. & Fodor, I. (2002). Evaluation of pseudorabies virus as a gene transfer vector and an oncolytic agent for human tumor cells. *Anticancer Res* **22**, 2153-9.

- Boldogkoi, Z. & Nogradi, A. (2003). Gene and cancer therapy--pseudorabies virus: a novel research and therapeutic tool? *Curr Gene Ther* **3**, 155-82.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heyneker, H. L. & Boyer, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**, 95-113.
- Bowers, W. J., Howard, D. F., Brooks, A. I., Halterman, M. W. & Federoff, H. J. (2001). Expression of vhs and VP16 during HSV-1 helper virus-free amplicon packaging enhances titers. *Gene Ther* **8**, 111-20.
- Brittle, E. E., Reynolds, A. E. & Enquist, L. W. (2004). Two modes of pseudorabies virus neuroinvasion and lethality in mice. *J Virol* **78**, 12951-63.
- Burton, E. A., Bai, Q., Goins, W. F. & Glorioso, J. C. (2002a). Replication-defective genomic herpes simplex vectors: design and production. *Curr Opin Biotechnol* **13**, 424-8.
- Burton, E. A., Fink, D. J. & Glorioso, J. C. (2002b). Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol* **21**, 915-36.
- Campbell, M. E. & Preston, C. M. (1987). DNA sequences which regulate the expression of the pseudorabies virus major immediate early gene. *Virology* **157**, 307-16.
- Coen, D. M., Kosz-Vnenchak, M., Jacobson, J. G., Leib, D. A., Bogard, C. L., Schaffer, P. A., Tyler, K. L. & Knipe, D. M. (1989). Thymidine kinase-negative herpes simplex virus mutants establish latency in mouse trigeminal ganglia but do not reactivate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4736-40.
- Cheung, A. K. (1989). DNA nucleotide sequence analysis of the immediate-early gene of pseudorabies virus. *Nucleic Acids Res* **17**, 4637-46.

- Chien, C. H., Shieh, J. Y., Liao, M. H., Ling, E. A. & Wen, C. Y. (1998). Neuronal connections between the auricular skin and the sympathetic pre- and postganglionic neurons of the dog as studied by using pseudorabies virus. *Neurosci Res* **30**, 169-75.
- Deiss, L. P., Chou, J. & Frenkel, N. (1986). Functional domains within the α sequence involved in the cleavage-packaging of herpes simplex virus DNA. *J Virol* **59**, 605-18.
- DeLuca, N. A., Courtney, M. A. & Schaffer, P. A. (1984). Temperature-sensitive mutants in herpes simplex virus type 1 ICP4 permissive for early gene expression. *J Virol* **52**, 767-76.
- DeLuca, N. A., McCarthy, A. M. & Schaffer, P. A. (1985). Isolation and characterization of deletion mutants of herpes simplex virus type 1 in the gene encoding immediate-early regulatory protein ICP4. *J Virol* **56**, 558-70.
- Dingwell, K. S., Brunetti, C. R., Hendricks, R. L., Tang, Q., Tang, M., Rainbow, A. J. & Johnson, D. C. (1994). Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread in vivo and across junctions of cultured cells. *J Virol* **68**, 834-45.
- Enquist, L. W., Husak, P. J., Banfield, B. W. & Smith, G. A. (1998). Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system. *Adv Virus Res* **51**, 237-347.
- Erlich, H.A (ed) (1989). PCR technology. Principles and applications for DNA amplification. Chapter 1, 7-23. Stockton Press.
- Fernández, A., Menendez del Campo, A. M., Fernandez, S., Camacho, A., Castro, J. M. & Tabares, E. (1999). Conversion of US3-encoded protein kinase gene from pseudorabies virus in a diploid gene located within inverted repeats by

- genetic recombination between the viral genome isomers. *Virus Res* **61**, 125-35.
- Ferrari, M., Mettenleiter, T. C., Romanelli, M. G., Cabassi, E., Corradi, A., Dal Mas, N. & Silini, R. (2000). A comparative study of pseudorabies virus (PRV) strains with defects in thymidine kinase and glycoprotein genes. *J Comp Pathol* **123**, 152-63.
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniello, V.R. & Skalka, A.M. (2000). Principles of virology molecular biology, pathogenesis, and control. Chapter 13, 456. ASM Press.
- Fraefel, C., Song, S., Lim, F., Lang, P., Yu, L., Wang, Y., Wild, P. & Geller, A. I. (1996). Helper virus-free transfer of herpes simplex virus type 1 plasmid vectors into neural cells. *J Virol* **70**, 7190-7.
- Frenkel, N. (2006). The history of the HSV amplicon: from naturally occurring defective genomes to engineered amplicon vectors. *Curr Gene Ther* **6**, 277-301.
- Gardlik, R., Palffy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Turna, J. & Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit* **11**, RA110-21.
- Gómez-Sebastián, S. & Tabarés, E. (2004). Negative regulation of herpes simplex virus type 1 ICP4 promoter by IE180 protein of pseudorabies virus. *J Gen Virol* **85**, 2125-30.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.

- Hanson, N., Henderson, G. & Jones, C. (1994). The herpes simplex virus type 2 gene which encodes the large subunit of ribonucleotide reductase has unusual regulatory properties. *Virus Res* **34**, 265-80.
- Harper, L., Demarchi, J. & Ben-Porat, T. (1986). Sequence of the genome ends and of the junction between the ends in concatemeric DNA of pseudorabies virus. *J Virol* **60**, 1183-5.
- Hayward, G.S. (1993). Immediate-early gene regulation in herpes simplex virus. *Sem in Virol* **4**, 15-23.
- Homa, F. L. & Brown, J. C. (1997). Capsid assembly and DNA packaging in herpes simplex virus. *Rev Med Virol* **7**, 107-122.
- Hong, Q., Qian, P., Li, X. M., Yu, X. L. & Chen, H. C. (2007). A recombinant pseudorabies virus co-expressing capsid proteins precursor P1-2A of FMDV and VP2 protein of porcine parvovirus: a trivalent vaccine candidate. *Biotechnol Lett*.
- Hooft van Iddekinge, B. J., de Wind, N., Wensvoort, G., Kimman, T. G., Gielkens, A. L. & Moormann, R. J. (1996). Comparison of the protective efficacy of recombinant pseudorabies viruses against pseudorabies and classical swine fever in pigs; influence of different promoters on gene expression and on protection. *Vaccine* **14**, 6-12.
- Huang, C. & Wu, C. Y. (2004). Characterization and expression of the pseudorabies virus early gene UL54. *J Virol Methods* **119**, 129-36.
- Ihara, S., Feldman, L., Watanabe, S. & Ben-Porat, T. (1983). Characterization of the immediate-early functions of pseudorabies virus. *Virology* **131**, 437-54.

- Irnaten, M., Neff, R. A., Wang, J., Loewy, A. D., Mettenleiter, T. C. & Mendelowitz, D. (2001). Activity of cardiorespiratory networks revealed by transsynaptic virus expressing GFP. *J Neurophysiol* **85**, 435-8.
- Jacobsen, L. B., Calvin, S. A., Colvin, K. E. & Wright, M. (2004). FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* **33**, 104-12.
- Jiang, Y., Fang, L., Xiao, S., Zhang, H., Pan, Y., Luo, R., Li, B. & Chen, H. (2007). Immunogenicity and protective efficacy of recombinant pseudorabies virus expressing the two major membrane-associated proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* **25**, 547-60.
- Jones, C., Zhu, F. & Dhanwada, K. R. (1993). Analysis of a herpes simplex virus 2 fragment from the open reading frame of the large subunit of ribonucleotide reductase with transcriptional regulatory activity. *DNA Cell Biol* **12**, 127-37.
- Jons, A. & Mettenleiter, T. C. (1997). Green fluorescent protein expressed by recombinant pseudorabies virus as an in vivo marker for viral replication. *J Virol Methods* **66**, 283-92.
- Ju, C., Fan, H., Tan, Y., Liu, Z., Xi, X., Cao, S., Wu, B. & Chen, H. (2005). Immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing ORF1-ORF2 fusion protein of porcine circovirus type 2. *Vet Microbiol* **109**, 179-90.
- Kanai, R., Tomita, H., Shinoda, A., Takahashi, M., Goldman, S., Okano, H., Kawase, T. & Yazaki, T. (2006). Enhanced therapeutic efficacy of G207 for the treatment of glioma through Musashi1 promoter retargeting of gamma34.5-mediated virulence. *Gene Ther* **13**, 106-16.
- Kelly, R. M. & Strick, P. L. (2000). Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J Neurosci Methods* **103**, 63-71.

- Kerman, I. A., Akil, H. & Watson, S. J. (2006). Rostral elements of sympatho-motor circuitry: a virally mediated transsynaptic tracing study. *J Neurosci* **26**, 3423-33.
- Kim, S. H., Wong, R. J., Kooby, D. A., Carew, J. F., Adusumilli, P. S., Patel, S. G., Shah, J. P. & Fong, Y. (2005). Combination of mutated herpes simplex virus type 1 (G207 virus) with radiation for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* **41**, 313-22.
- Klupp, B. G., Granzow, H., Karger, A. & Mettenleiter, T. C. (2005). Identification, subviral localization, and functional characterization of the pseudorabies virus UL17 protein. *J Virol* **79**, 13442-53.
- Klupp, B. G., Hengartner, C. J., Mettenleiter, T. C. & Enquist, L. W. (2004). Complete, annotated sequence of the pseudorabies virus genome. *J Virol* **78**, 424-40.
- Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Martin, M.A., Lamb, R.A., Roizman, B. & Straus, S.E (eds.)(2001). Fields in Virology. Chapters 71-73, 2381-2511. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins. P.A.
- Kopp, M., Klupp, B. G., Granzow, H., Fuchs, W. & Mettenleiter, T. C. (2002). Identification and characterization of the pseudorabies virus tegument proteins UL46 and UL47: role for UL47 in virion morphogenesis in the cytoplasm. *J Virol* **76**, 8820-33.
- Kovacs, F. & Mettenleiter, T. C. (1991). Firefly luciferase as a marker for herpesvirus (pseudorabies virus) replication in vitro and in vivo. *J Gen Virol* **72 (Pt 12)**, 2999-3008.

- Ladin, B. F., Blankenship, M. L. & Ben-Porat, T. (1980). Replication of herpesvirus DNA. V. Maturation of concatemeric DNA of pseudorabies virus to genome length is related to capsid formation. *J Virol* **33**, 1151-64.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lin, J. J., Smith, M., Jessee, J. & Bloom, F. (1992). DH11S: an Escherichia coli strain for preparation of single-stranded DNA from phagemid vectors. *Biotechniques* **12**, 718-21.
- Lundh, B. (1990). Spread of vesicular stomatitis virus along the visual pathways after retinal infection in the mouse. *Acta Neuropathol (Berl)* **79**, 395-401.
- Maga, G., Verri, A., Bonizzi, L., Ponti, W., Poli, G., Garbesi, A., Niccolai, D., Spadari, S. & Fochoer, F. (1993). Lack of stereospecificity of suid pseudorabies virus thymidine kinase. *Biochem J* **294 (Pt 2)**, 381-5.
- McFerran, J. B. & Dow, C. (1975). Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. *Res Vet Sci* **19**, 17-22.
- McVoy, M. A., Nixon, D. E., Adler, S. P. & Mocarski, E. S. (1998). Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J Virol* **72**, 48-56.
- Mettenleiter, T. C. (2000). Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis--state of the art, June 1999. *Vet Res* **31**, 99-115.
- Mettenleiter, T. C. (2002). Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* **76**, 1537-47.

- Mettenleiter, T. C. & Rauh, I. (1990). A glycoprotein gX-beta-galactosidase fusion gene as insertional marker for rapid identification of pseudorabies virus mutants. *J Virol Methods* **30**, 55-65.
- Mettenleiter, T. C., Saalmuller, A. & Weiland, F. (1993). Pseudorabies virus protein homologous to herpes simplex virus type 1 ICP18.5 is necessary for capsid maturation. *J Virol* **67**, 1236-45.
- Mulder, W., Pol, J., Kimman, T., Kok, G., Priem, J. & Peeters, B. (1996). Glycoprotein D-negative pseudorabies virus can spread transneuronally via direct neuron-to-neuron transmission in its natural host, the pig, but not after additional inactivation of gE or gI. *J Virol* **70**, 2191-200.
- Mulder, W. A., Jacobs, L., Priem, J., Kok, G. L., Wagenaar, F., Kimman, T. G. & Pol, J. M. (1994). Glycoprotein gE-negative pseudorabies virus has a reduced capability to infect second- and third-order neurons of the olfactory and trigeminal routes in the porcine central nervous system. *J Gen Virol* **75** (Pt 11), 3095-106.
- Muñoz, A. L., Prieto, C. & Tabares, E. (2006). A comparison of enhanced green fluorescent protein expression induced by immediate-early cytomegalovirus (IE-CMV) and gG pseudorabies virus (gG-PRV) promoters, using pseudorabies virus amplicons as vectors. *J Virol Methods* **136**, 257-60.
- Narayanan, K., Williamson, R., Zhang, Y., Stewart, A. F. & Ioannou, P. A. (1999). Efficient and precise engineering of a 200 kb beta-globin human/bacterial artificial chromosome in E. coli DH10B using an inducible homologous recombination system. *Gene Ther* **6**, 442-7.
- Nauwynck, H., Glorieux, S., Favoreel, H. & Pensaert, M. (2007). Cell biological and molecular characteristics of pseudorabies virus infections in cell cultures and in pigs with emphasis on the respiratory tract. *Vet Res* **38**, 229-41.

- Newcomb, W. W., Trus, B. L., Booy, F. P., Steven, A. C., Wall, J. S. & Brown, J. C. (1993). Structure of the herpes simplex virus capsid. Molecular composition of the pentons and the triplexes. *J Mol Biol* **232**, 499-511.
- Oehmig, A., Fraefel, C. & Breakefield, X. O. (2004a). Update on herpesvirus amplicon vectors. *Mol Ther* **10**, 630-43.
- Oehmig, A., Fraefel, C., Breakefield, X. O. & Ackermann, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 amplicons and their hybrid virus partners, EBV, AAV, and retrovirus. *Curr Gene Ther* **4**, 385-408.
- Orford, M., Nefedov, M., Vadolas, J., Zaibak, F., Williamson, R. & Ioannou, P. A. (2000). Engineering EGFP reporter constructs into a 200 kb human beta-globin BAC clone using GET Recombination. *Nucleic Acids Res* **28**, E84.
- Osorio, F. A. & Rock, D. L. (1992). A murine model of pseudorabies virus latency. *Microb Pathog* **12**, 39-46.
- Osten, P., Grinevich, V. & Cetin, A. (2007). Viral vectors: a wide range of choices and high levels of service. *Handb Exp Pharmacol*, 177-202.
- Paul, P. S., Halbur, P., Janke, B., Joo, H., Nawagitgul, P., Singh, J. & Sorden, S. (2003). Exogenous porcine viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **278**, 125-83.
- Peeters, B., Bienkowska-Szewczyk, K., Hulst, M., Gielkens, A. & Kimman, T. (1997). Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. *J Gen Virol* **78** (Pt 12), 3311-5.
- Pomeranz, L. E., Reynolds, A. E. & Hengartner, C. J. (2005). Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 462-500.

- Post, L. E., Mackem, S. & Roizman, B. (1981). Regulation of alpha genes of herpes simplex virus: expression of chimeric genes produced by fusion of thymidine kinase with alpha gene promoters. *Cell* **24**, 555-65.
- Preston, C. M., Cordingley, M. G. & Stow, N. D. (1984). Analysis of DNA sequences which regulate the transcription of a herpes simplex virus immediate early gene. *J Virol* **50**, 708-16.
- Prieto, J., Martin Hernandez, A. M. & Tabares, E. (1991). Loss of pseudorabies virus thymidine kinase activity due to a single base mutation and amino acid substitution. *J Gen Virol* **72 (Pt 6)**, 1435-9.
- Prieto, J., Solera, J. & Tabares, E. (2002). Development of new expression vector based on Pseudorabies virus amplicons: application to human insulin expression. *Virus Res* **89**, 123-9.
- Rall, G. F., Kupersmidt, S., Sugg, N., Veatch, R. A. & Ben-Porat, T. (1992). Functions of the sequences at the ends of the inverted repeats of pseudorabies virus. *J Virol* **66**, 1506-19.
- Rea, T. J., Timmins, J. G., Long, G. W. & Post, L. E. (1985). Mapping and sequence of the gene for the pseudorabies virus glycoprotein which accumulates in the medium of infected cells. *J Virol* **54**, 21-9.
- Reed, J.L & Muench, A. (1938). A simple method of estimating 50 percent end points. *Am J Hyg* **27**, 493-497.
- Roizman, B., Richard, J. & López C. (eds)(1993). The human Herpesviruses. Chapters 1-2, 1-11. Raven Press. Ltd.

- Rziha, H. J., Mettenleiter, T. C., Ohlinger, V. & Wittmann, G. (1986). Herpesvirus (pseudorabies virus) latency in swine: occurrence and physical state of viral DNA in neural tissues. *Virology* **155**, 600-13.
- Saeki, Y., Breakefield, X. O. & Chiocca, E. A. (2003). Improved HSV-1 amplicon packaging system using ICP27-deleted, oversized HSV-1 BAC DNA. *Methods Mol Med* **76**, 51-60.
- Saeki, Y., Ichikawa, T., Saeki, A., Chiocca, E. A., Tobler, K., Ackermann, M., Breakefield, X. O. & Fraefel, C. (1998). Herpes simplex virus type 1 DNA amplified as bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: rescue of replication-competent virus progeny and packaging of amplicon vectors. *Hum Gene Ther* **9**, 2787-94.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001). Molecular cloning a laboratory manual. 3^a ed. CSHL Press.
- Sawitzky, D. (1997). Transmission, species specificity, and pathogenicity of Aujeszky's disease virus. *Arch Virol Suppl* **13**, 201-6.
- Shah, K. & Breakefield, X. O. (2006). HSV amplicon vectors for cancer therapy. *Curr Gene Ther* **6**, 361-70.
- Shiau, A. L., Lin, Y. P., Shieh, G. S., Su, C. H., Wu, W. L., Tsai, Y. S., Cheng, C. W., Lai, M. D. & Wu, C. L. (2007). Development of a Conditionally Replicating Pseudorabies Virus for HER-2/neu-overexpressing Bladder Cancer Therapy. *Mol Ther* **15**, 131-8.
- Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y. & Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in Escherichia coli using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8794-7.

- Smith, B. N., Banfield, B. W., Smeraski, C. A., Wilcox, C. L., Dudek, F. E., Enquist, L. W. & Pickard, G. E. (2000). Pseudorabies virus expressing enhanced green fluorescent protein: A tool for in vitro electrophysiological analysis of transsynaptically labeled neurons in identified central nervous system circuits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9264-9.
- Smith, C. C., Peng, T., Kulka, M. & Aurelian, L. (1998). The PK domain of the large subunit of herpes simplex virus type 2 ribonucleotide reductase (ICP10) is required for immediate-early gene expression and virus growth. *J Virol* **72**, 9131-41.
- Smith, G. A. & Enquist, L. W. (1999). Construction and transposon mutagenesis in *Escherichia coli* of a full-length infectious clone of pseudorabies virus, an alphaherpesvirus. *J Virol* **73**, 6405-14.
- Smith, G. A. & Enquist, L. W. (2000). A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4873-8.
- Song, T. J., Eisenberg, D. P., Adusumilli, P. S., Hezel, M. & Fong, Y. (2006). Oncolytic herpes viral therapy is effective in the treatment of hepatocellular carcinoma cell lines. *J Gastrointest Surg* **10**, 532-42.
- Spear, P. G. & Longnecker, R. (2003). Herpesvirus entry: an update. *J Virol* **77**, 10179-85.
- Spector, D., Purves, F. & Roizman, B. (1991). Role of alpha-transinducing factor (VP16) in the induction of alpha genes within the context of viral genomes. *J Virol* **65**, 3504-13.
- Stevely, W. S. (1977). Inverted repetition in the chromosome of pseudorabies virus. *J Virol* **22**, 232-4.

- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* **219**, 37-44.
- Sze, P. & Herman, R. C. (1992). The herpes simplex virus type 1 ICP6 gene is regulated by a 'leaky' early promoter. *Virus Res* **26**, 141-52.
- Tabares, E., Fernandez, M., Salvador-Temprano, E., Carnero, M. E. & Sanchez-Botija, C. (1981). A reliable enzyme linked immunosorbent assay for African swine fever using the major structural protein as antigenic reagent. *Arch Virol* **70**, 297-300.
- Tenser, R. B., Ressel, S. & Dunstan, M. E. (1981). Herpes simplex virus thymidine kinase expression in trigeminal ganglion infection: correlation of enzyme activity with ganglion virus titer and evidence of in vivo complementation. *Virology* **112**, 328-41.
- Terada, K., Wakimoto, H., Tyminski, E., Chiocca, E. A. & Saeki, Y. (2006). Development of a rapid method to generate multiple oncolytic HSV vectors and their in vivo evaluation using syngeneic mouse tumor models. *Gene Ther* **13**, 705-14.
- Thomsen, D. R., Marchioli, C. C., Yancey, R. J., Jr. & Post, L. E. (1987a). Replication and virulence of pseudorabies virus mutants lacking glycoprotein gX. *J Virol* **61**, 229-32.
- Thomsen, D. R., Marotti, K. R., Palermo, D. P. & Post, L. E. (1987b). Pseudorabies virus as a live virus vector for expression of foreign genes. *Gene* **57**, 261-5.
- Tian, Z. J., Zhou, G. H., Zheng, B. L., Qiu, H. J., Ni, J. Q., Yang, H. L., Yin, X. N., Hu, S. P. & Tong, G. Z. (2006). A recombinant pseudorabies virus encoding the HA gene from H3N2 subtype swine influenza virus protects mice from virulent challenge. *Vet Immunol Immunopathol* **111**, 211-8.

- Tirabassi, R. S., Townley, R. A., Eldridge, M. G. & Enquist, L. W. (1998). Molecular mechanisms of neurotropic herpesvirus invasion and spread in the CNS. *Neurosci Biobehav Rev* **22**, 709-20.
- Toda, M., Iizuka, Y., Kawase, T., Uyemura, K. & Kawakami, Y. (2002). Immuno-viral therapy of brain tumors by combination of viral therapy with cancer vaccination using a replication-conditional HSV. *Cancer Gene Ther* **9**, 356-64.
- Tyler, C. M., Wuertzer, C. A., Bowers, W. J. & Federoff, H. J. (2006). HSV amplicons: neuro applications. *Curr Gene Ther* **6**, 337-50.
- Verma, I. M. & Weitzman, M. D. (2005). Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem* **74**, 711-38.
- Walboomers, J. M. & Schegget, J. T. (1976). A new method for the isolation of herpes simplex virus type 2 DNA. *Virology* **74**, 256-8.
- Watson, N. (1988). A new revision of the sequence of plasmid pBR322. *Gene* **70**, 399-403.
- Weigel, R. M., Hahn, E. C. & Scherba, G. (2003). Survival and immunization of raccoons after exposure to pseudorabies (Aujeszky's disease) virus gene-deleted vaccines. *Vet Microbiol* **92**, 19-24.
- Winkeler, A., Sena-Esteves, M., Paulis, L. E., Li, H., Waerzeggers, Y., Ruckriem, B., Himmelreich, U., Klein, M., Monfared, P., Rueger, M. A., Heneka, M., Vollmar, S., Hoehn, M., Fraefel, C., Graf, R., Wienhard, K., Heiss, W. D. & Jacobs, A. H. (2007). Switching on the lights for gene therapy. *PLoS ONE* **2**, e528.

- Wittmann, G., Jakubik, J. & Ahl, R. (1980). Multiplication and distribution of Aujeszky's disease (pseudorabies) virus in vaccinated and non-vaccinated pigs after intranasal infection. *Arch Virol* **66**, 227-40.
- Wollmann, G., Tattersall, P. & van den Pol, A. N. (2005). Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. *J Virol* **79**, 6005-22.
- Wong, M. L., Ho, T. Y., Huang, J. H., Hsiang, C. Y. & Chang, T. J. (1997). Stimulation of type I DNA topoisomerase gene expression by pseudorabies virus. *Arch Virol* **142**, 2099-105.
- Wong, T. K. & Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* **107**, 584-7.
- Xu, G., Xu, X., Li, Z., He, Q., Wu, B., Sun, S. & Chen, H. (2004). Construction of recombinant pseudorabies virus expressing NS1 protein of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and its safety and immunogenicity. *Vaccine* **22**, 1846-53.
- Yamada, S. & Shimizu, M. (1994). Pseudorabies virus immediate-early regulatory protein IE180 expressed by recombinant baculovirus is functional. *Virology* **202**, 491-5.
- Yin, J., Ren, X., Tian, Z. & Li, Y. (2007). Assembly of pseudorabies virus genome-based transfer vehicle carrying major antigen sites of S gene of transmissible gastroenteritis virus: potential perspective for developing live vector vaccines. *Biologicals* **35**, 55-61.